

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Untersuchungen zur antitumoralen Wirkung von  
Malariamedikamenten auf Brustkrebszellen am Beispiel von  
Primaquin und Chloroquin**

**Dissertation**

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Giovanna Giampieri**  
aus Berlin  
2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Lars Lindner  
Prof. Dr. Elmar Richter

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2018



*Für meine Eltern in Dankbarkeit*

## **Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                                     | <b>1</b>  |
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1 Brustkrebs: Überblick und aktuelle Therapieansätze .....          | 3         |
| 1.1.2 HSP90: ein neues Target in der Krebstherapie? .....             | 4         |
| 1.2 Die Malariaerkrankung .....                                       | 6         |
| 1.2.1 Primaquin als Malariamedikament .....                           | 8         |
| 1.2.2 Der Primaquin Metabolismus .....                                | 11        |
| 1.2.3 Primaquin Nebenwirkungen .....                                  | 11        |
| 1.3 Malariamedikamente in der Krebstherapie .....                     | 12        |
| 1.3.1 Chloroquin .....  | 13        |
| 1.3.2 Artemisinin .....   | 14        |
| 1.4 Oxidativer Stress .....   | 16        |
| 1.4.1 Antioxidanzien.....   | 20        |
| 1.4.2 Das Cytochrom P450-System.....                                  | 22        |
| 1.5 Fragestellungen und Zielsetzung.....                              | 24        |
| <b>2 Materialien und Methoden.....</b>                                | <b>25</b> |
| 2.1 Materialien.....  | 25        |
| 2.1.1 Allgemein verwendete Materialien .....                          | 25        |
| 2.1.2 Untersuchte Substanzen.....                                     | 26        |
| 2.1.3 Verwendete Materialien für die Zellkultur.....                  | 26        |
| 2.1.4 Verwendete Materialien für Zellfärbungen .....                  | 28        |
| 2.1.5 Verwendete Materialien für die Proteinbiochemie.....            | 28        |
| 2.1.6 Verwendete Materialien für die Molekularbiologie .....          | 30        |
| 2.1.7 Verwendete Materialien für die Immunfluoreszenzmikroskopie..... | 31        |
| 2.1.8 Verwendete Materialien für FACS-Analysen .....                  | 32        |
| 2.2 Methoden.....   | 32        |
| 2.2.1 Kultivierung von Tumorzellen .....                              | 32        |

## -Inhaltsverzeichnis-

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.2 MTT-Zellvitalitätstest.....  | 32        |
| 2.2.3 Tumorsphäroide.....  | 33        |
| 2.2.4 Klonassay .....  | 33        |
| 2.2.5 Phasenkontrastmikroskopie und Zellfärbung.....   | 34        |
| 2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie .....  | 35        |
| 2.2.7 FACS-Analyse .....   | 35        |
| 2.2.7.1 Grundlagen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.....   | 35        |
| 2.2.7.2 Annexin-Assay .....  | 36        |
| 2.2.7.3 FACS-Analyse zur Induktion von Superoxidradikalen und<br>Gesamt-ROS.....                       | 36        |
| 2.2.8 Western Blot- Analyse .....  | 37        |
| 2.2.8.1 Herstellung der Zelllysate .....   | 37        |
| 2.2.8.2 Durchführung der Gelelektrophorese .....   | 38        |
| 2.2.8.3 Western Blot Methode.....  | 38        |
| 2.2.9 PCR-Analyse .....  | 40        |
| 2.2.9.1 RNA Isolierung.....  | 40        |
| 2.2.9.2 Reverse Transkription.....   | 40        |
| 2.2.9.3 Polymerasekettenreaktion .....   | 40        |
| 2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese .....   | 41        |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>  | <b>42</b> |
| 3.1 Einfluss von Primaquin und Chloroquin auf das Tumorzellwachstum.....                               | 42        |
| 3.2 Untersuchungen zur HSP90 Inhibierung durch Primaquin .....   | 44        |
| 3.3 Untersuchungen zum Zelltod durch Primaquin an MCF-7- Zellen.....                                   | 46        |
| 3.3.1 Der Einfluss von Primaquin auf die Morphologie und Autophagie von<br>Tumorzellen .....           | 46        |
| 3.3.2 Primaquin hemmt die Expression von Ki67 in MCF-7- Tumorzellen .....                              | 49        |
| 3.3.3 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch Primaquin<br>in Brustkrebszellen ..... | 51        |
| 3.3.4 Induktion von oxidativem Stress durch Primaquin in Brustkrebszellen.....                         | 54        |
| 3.3.4.1 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7- Zellen durch Primaquin ..                      | 54        |

## -Inhaltsverzeichnis-

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.4.2 Zytoprotektiver Effekt von N-Acetyl-Cystein .....  | 58        |
| 3.4 Expression von Cytochrom P450-Isoenzymen in Brustkrebszellen und Induktion<br>durch Primaquin .....                                      | 59        |
| 3.5 Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Primaquin durch Auranofin.....   | 60        |
| 3.6 Langfristiger wachstumshemmender Effekt von Primaquin.....   | 63        |
| <b>4 Diskussion .....</b>  | <b>64</b> |
| 4.1 Voruntersuchungen zur antitumoralen Wirkung von Quinolinen .....   | 65        |
| 4.2 Primaquin induzierter Zelltod: Apoptose versus Nekrose.....  | 66        |
| 4.3 Überexpression von CYP450-Enzymen in Tumorzellen: Zielstruktur für die<br>selektive Aktivierung von Primaquin in Brustkrebszellen? ..... | 70        |
| 4.4 Limitation .....   | 72        |
| 4.5 Ausblick.....  | 73        |
| <b>5 Zusammenfassung.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b>  |           |
| <b>Danksagung</b>  |           |
| <b>Eidesstattliche Versicherung</b>  |           |
| <b>Lebenslauf</b>  |           |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>17-AAG</b>                   | Tanespimycin (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin)  |
| <b>17-DMAG</b>                  | 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin  |
| <b>AIDS</b>                     | Acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immundefektsyndrom  |
| <b>AKT</b>                      | Proteinkinase B  |
| <b>ATP</b>                      | Adenosintriphosphat  |
| <b>Aur</b>                      | Auranofin  |
| <b>Bak</b>                      | Bcl-2 homologous antagonist/killer   |
| <b>Bax</b>                      | Bcl-2 associated X Protein   |
| <b>BCIP</b>                     | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate   |
| <b>Bcl-2</b>                    | B-cell-lymphoma 2  |
| <b>Bcr-abl</b>                  | Fusionsgen aus Bcr (break point cluster region) und abl (abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) |
| <b>cDNA</b>                     | Copy DNA   |
| <b>cmax</b>                     | Maximale Plasmakonzentration   |
| <b>CYP</b>                      | Cytochrom P450   |
| <b>DAPI</b>                     | 4',6-Diamidin-2-Phenylindol  |
| <b>CDC25A</b>                   | Cell division cycle 25A  |
| <b>DMSO</b>                     | Dimethylsulfoxid   |
| <b>DNA</b>                      | Desoxyribonukleinsäure   |
| <b>dNTP</b>                     | Desoxyribonukleosidtriphosphat   |
| <b>EGFR</b>                     | Epidermal growth factor receptor   |
| <b>ELISA</b>                    | Enzyme-linked Immunosorbent Assay  |
| <b>ER</b>                       | Endoplasmatisches Retikulum  |
| <b>FACS</b>                     | Fluorescence-activated cell sorting  |
| <b>FITC</b>                     | Fluoreszein Isothiocyanat  |
| <b>GENICA</b>                   | gene-environment interaction and breast cancer in germany  |
| <b>GM</b>                       | Geldanamycin   |
| <b>GR</b>                       | Glukokortikoidrezeptor   |
| <b>GSH</b>                      | Reduziertes Glutathion   |
| <b>GSSG</b>                     | Oxidiertes Glutathion  |
| <b>HepG2</b>                    | Human hepatocellular carcinoma cell line   |
| <b>HSP90</b>                    | Hitzeschockprotein von 90 kDa Molekulargewicht   |
| <b>HER-2</b>                    | Human epidermal growth factor receptor 2   |
| <b>HSF-1</b>                    | Heat shock factor 1  |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  |
| <b>HIV</b>                      | Humanes Immundefizienz Virus   |
| <b>i.v.</b>                     | intravenös   |
| <b>JC-1</b>                     | 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide                              |
| <b>kDa</b>                      | Kilodalton   |
| <b>Kg</b>                       | Kilogramm  |

---



-Abkürzungsverzeichnis-

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>KG</b>       | Körpergewicht   |
| <b>Ki67</b>     | Proliferationsmarker entdeckt in Kiel von Zellklon 67                               |
| <b>LC3b</b>     | Microtubule-associated protein light chain 3  |
| <b>MAO</b>      | Monoaminoxidase   |
| <b>MCF7</b>     | Michigan Cancer Foundation 7  |
| <b>MDA-MB</b>   | Adenokarzinom Brustkrebszellen  |
| <b>MDC</b>      | Monodansylcadaverine  |
| <b>M-MLV</b>    | Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase                                 |
| <b>mRNA</b>     | Messenger RNA   |
| <b>mTOR</b>     | Mammalian target of rapamycin   |
| <b>MTT</b>      | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                          |
| <b>NAC</b>      | N-Acetyl-Cystein  |
| <b>NAD(P)H</b>  | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)   |
| <b>NBT</b>      | Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid   |
| <b>NO</b>       | Stickstoffmonoxid   |
| <b>OD</b>       | Optische Dichte   |
| <b>PARP</b>     | Poly(ADP-Ribose)-Polymerase   |
| <b>PBS</b>      | Phosphatgepufferte Salzlösung   |
| <b>PCR</b>      | Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion                                |
| <b>PI</b>       | Propidiumiodid  |
| <b>p.i.</b>     | Per infusionem  |
| <b>PQ</b>       | Primaquin   |
| <b>PQ1</b>      | 6-methoxy-8-[(3-aminopropyl)amino]-4-methyl-5-(3-trifluoromethylphenyloxy)quinoline |
| <b>PVDF</b>     | Polyvinylidenfluorid  |
| <b>RC</b>       | Radicicol   |
| <b>RIPA</b>     | Radio-Immunoprecipitation Assay   |
| <b>RNA</b>      | Ribonukleinsäure  |
| <b>RNS</b>      | Reaktive Stickstoffspezies  |
| <b>ROS</b>      | Reaktive Sauerstoffspezies  |
| <b>rpm</b>      | Rounds per minute   |
| <b>RT</b>       | Reverse Transkriptase   |
| <b>SDS</b>      | Sodium dodecyl sulfate  |
| <b>SOD</b>      | Superoxiddismutase  |
| <b>T47D</b>     | Human ductal breast epithelial tumor cell line                                      |
| <b>TC7</b>      | Zellklon der Caco-2 Linie (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells)        |
| <b>Tris</b>     | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| <b>TRX</b>      | Thioredoxin   |
| <b>UV-Licht</b> | Ultraviolette Licht   |
| <b>VEGF</b>     | Vascular endothelial growth factor  |
| <b>v-KIT</b>    | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog                       |
| <b>WHO</b>      | World health organisation, Weltgesundheitsorganisation                              |

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs: Überblick und aktuelle Therapieansätze

Brustkrebs ist die weltweit häufigste weibliche Krebserkrankung (Siegel et al. 2015) und stellt pathologisch eine sehr heterogene Gruppe dar (Verma et al. 2012). In Bezug auf die Therapie wird die Erkrankung klinisch in Hormonrezeptor-positive, HER-2-Rezeptor-positive und triple-negative Formen unterteilt (Mohamed et al. 2013). Tumore, die Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren exprimieren gelten als hormonrezeptor-positiv (ER+/ PR+). Die Hormontherapie mit Östrogenrezeptormodulatoren (Tamoxifen) und Aromatasehemmern (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) gilt heute als Standard in der adjuvanten Therapie dieser Tumorart (Goldhirsch et al. 2009; Untch et al. 2013).

HER-2 (erbB2/neu) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). Diese sind Tyrosinkinaserzeptoren, die das Zellwachstum- und Überleben fördern (Mohamed et al. 2013). Ungefähr 20 % der Brustkrebsformen weisen eine Überexpression des HER-2- Onkogens auf und werden als HER-2-positiv bezeichnet (Hudis 2007). HER-2-positive Tumore weisen einen aggressiveren Phänotyp auf mit einem erhöhten Rezidivrisiko (Mohamed et al. 2013). Allerdings existiert für diese Form des Brustkrebs eine zielgerichtete adjuvante Therapie, sogenannte „Targeted therapy“, in Form einer HER-2-Rezeptor-Blockade mit einem monoklonalen Antikörper (Trastuzumab). Diese anti-HER-2-Therapie erfolgt für 1 Jahr in Kombination mit taxanhaltiger Zytostatikatherapie (Untch et al. 2013; Goldhirsch et al. 2009).

Triple-negativer Brustkrebs ist eine heterogene Gruppe, die phänotypisch durch das Fehlen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie auch dem Fehlen einer HER-2-Überexpression charakterisiert ist. Diese Form des Brustkrebs macht ca. 15-20% aus, betrifft häufiger junge Frauen und ist durch einen aggressiven Phänotyp, kurzes krankheitsfreies Intervall und schlechte Prognose mit häufigen Rezidiven in Form von Fernmetastasen gekennzeichnet (Arnedos et al. 2012; Tao et al. 2014). Im Gegensatz zu Hormonrezeptor- oder HER-2-Rezeptor-positiven Formen gibt es für triple-negative Tumore keine zielgerichtete Therapie, was diese Brustkrebsart mit der Zytostatikatherapie als einzige vorhandene Systemtherapie vor eine große Herausforderung in der Therapie, vor allem chemoresistenter Formen, stellt (Arnedos et al. 2012). Anthrazyklin- und Taxanhaltige Kombinationen sind Standardchemotherapien und das Hauptstandbein in der Therapie triple-negativer Mammakarzinome (Goldhirsch et al. 2009; Gandhi et al. 2015).

Das Fehlen spezifischer Therapieoptionen für triple-negative Brustkrebsformen und die häufige Entwicklung von Resistenzen gegenüber vorhandenen zielgerichteten Therapien, wie

Trastuzumab, erfordern die stetige Suche nach neuen Zielmolekülen in der Therapie des Mammakarzinoms (Mohamed et al. 2013; Yardley 2013).

Eine Möglichkeit neue Medikamente in einer zeit- und kostensparenden Form für die Krebstherapie zu entwickeln, ist die Suche nach neuen Indikationen für bereits erprobte und genehmigte Medikamente, die sogenannte Medikamentenrepositionierung (Li and Jones 2012). Die Rationale dafür basiert darauf, dass Moleküle unter den zahlreichen Zellproteinen nicht an ein einziges Zielprotein binden, sondern mehrere Zielstrukturen besitzen, deren Blockade in mehreren Erkrankungen von Relevanz sein kann (Power et al. 2014).

Zum Beispiel hemmt das in der antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion eingesetzte Nelfinavir nicht nur die HIV-1-Protease, sondern auch die Proteinkinase B/ AKT, welche als Serin-/Threonin Kinase das Zellüberleben- und die Proliferation fördert und somit in der Entstehung und Progression von zahlreichen Tumoren eine wichtige Rolle spielt (Chow et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil der Medikamentenrepositionierung ist, dass die Pharmakokinetik der Medikamente und die Sicherheit im Menschen bereits in klinischen Studien erprobt ist, was neben Zeit und Kosten auch das Risiko minimiert klinische Studien in fortgeschrittenen Phasen auf Grund zu hoher Toxizität und starker Nebenwirkungen abbrechen zu müssen (Ashburn and Thor 2004).

Die Repositionierung beschränkt sich nicht nur auf Medikamente, die derzeit auf dem Markt sind, sondern umfasst auch Pharmaka, die vom Markt genommen wurden, wie z.B. das Sedativum Thalidomid, das stark teratogen wirkt, jedoch heute zur Behandlung des multiplen Myeloms und Lepra eingesetzt wird (Kim and Scialli 2011) und Medikamente, die zwar ein gutes Sicherheitsprofil aufweisen, jedoch für ihre ursprüngliche Indikation keine ausreichende Wirksamkeit aufweisen (Banno et al. 2015).

### **1.1.2 HSP90: ein neues Target in der Krebstherapie?**

Ausgehend von Hinweisen einer Vorpublikation (Al-Sha'er and Taha 2010) sollte im Rahmen dieser Arbeit unter anderem untersucht werden, ob das Malariamedikament Primaquin, als möglicher HSP90-Inhibitor, ein neuer interessanter Kandidat für die Krebstherapie sein könnte. Zum besseren Verständnis soll hier die Funktion dieses Proteins und die Rolle in der Karzinogenese kurz erläutert werden.

Das Stress-/ oder Hitzeschockprotein HSP90 ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa und besteht aus zwei Isoformen, HSP90  $\alpha$  und HSP90  $\beta$ . Als molekulares Chaperon spielt es eine essentielle Rolle für das Zellüberleben, indem es bei der korrekten Faltung von Proteinen hilft, denaturierte Proteine zurückfaltet und so deren Aggregation verhindert, sowie die Stabilität zahlreicher sogenannter „client“ Proteine

gewährleistet (Wiech et al. 1992). Unter normalen Bedingungen macht HSP90 1-2% der Zellproteine im Zytosol und Zellkern aus. Stressfaktoren, die häufig mit Tumoren assoziiert sind wie Hitze, Hypoxie, Azidose oder Nährstoffmangel führen zu einer verstärkten HSP90-Expression, um das Zellüberleben in diesen geschädigten Zellen zu schützen (Bagatell et al. 2000; Bagatell and Whitesell 2004). Viele der HSP90 „client“ Proteine sind onkogene Signalproteine, die Schlüsselfunktionen in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren besitzen, wie Kinasen (HER-2, AKT, bcr-abl), Transkriptionsfaktoren (HIF1 $\alpha$  = hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ ), Steroidhormonrezeptoren und Antiapoptosefaktoren (siehe [www.picard.ch/HSP90Int/index.php](http://www.picard.ch/HSP90Int/index.php)).

HSP90 liegt als Homodimer vor mit einer N-terminalen Domäne, die eine Nukleotidtasche mit ATPase- Funktion besitzt, einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne und eine Mittelregion, die mit den Substratproteinen und weiteren Cochaperonen assembliert. Für die Funktion als Chaperon wird ATP in wiederkehrenden Zyklen gebunden und hydrolysiert, was die treibende Energie für eine Konformationsänderung des Chaperons und seine Interaktion mit den „client“ Proteinen liefert (Workman et al. 2007).

Da HSP90 in Tumorzellen überexprimiert wird und hohe Konzentrationen bei Mammakarzinomen mit einer schlechten Prognose und Gesamtüberleben assoziiert sind (Pick et al. 2007), stellt dieses molekulare Chaperon einen wichtigen molekularen Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar. Charakteristisch für Tumorzellen sind Mutationen in Signalproteinen, wodurch sie der Wachstumskontrolle entgehen und sich der Apoptose entziehen können. Diese genetische Instabilität kann jedoch nur durch die stabilisierende Funktion der Chaperone fortbestehen, was Tumorzellen von einer normalen Funktion der HSP90 Chaperone abhängig macht (Porter et al. 2010). Ein wesentlicher Vorteil der HSP90-Inhibition ist, dass gleichzeitig verschiedene onkogene Signalwege in Tumorzellen blockiert werden, wodurch einerseits der Ausbildung von Feedbackmechanismen, andererseits der Entwicklung von Resistenzen, die häufig unter „Target-Therapien“ zu beobachten sind, entgegengewirkt wird (Maloney and Workman 2002; Garraway and Jänne 2012).

Obwohl HSP90 eine lebenswichtige Funktion in allen Zellen besitzt, kann es dennoch als molekularer Angriffspunkt in der Tumorthherapie verwendet werden, da HSP90-Inhibitoren eine Selektivität für Tumorzellen aufweisen und spezifisch dort akkumulieren, wohingegen sie schnell aus dem Blutplasma und dem normalen Gewebe entfernt werden. In Tumorzellen liegt HSP90 als Multichaperon-Komplex vor, der eine höhere ATP-ase-Aktivität und eine höhere Affinität gegenüber HSP90-Inhibitoren besitzt verglichen mit normalen Zellen (Kamal et al. 2003).

Die natürlichen HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol, sowie ihre synthetischen Derivate 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) und 17-DMAG binden als Nukleotidmimetika an die N-terminale ATP-Domäne und unterbrechen so den strukturierten

Ablauf des Chaperon Zyklus, was zur Destabilisierung der Proteine, ihrer Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom führt (Prodromou and Pearl 2003).

Zur Zeit laufen mehrere klinische Studien, die 17 verschiedene HSP90-Inhibitoren als Monotherapie und in Kombination mit anderen zielgerichteten Therapien an unterschiedlichen Tumorarten testen (Barrott and Haystead 2013). Eine der wichtigsten klinischen Indikationen ist die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit Trastuzumab in HER-2-positivem, Trastuzumab resistentem Brustkrebs, wo bereits erfolversprechende Ergebnisse verzeichnet werden konnten (Modi et al. 2007; Modi et al. 2011). Desweiteren konnten synergistische Wirkungen in Kombination mit klassischen Zytostatika und ionisierender Strahlung nachgewiesen werden (Münster et al. 2001; Enmon et al. 2003).

Interessanterweise wurde von dem Malariamedikament Primaquin beschrieben, dass es die Aktivität von HSP90 inhibieren kann. In dieser Arbeit wurde darum getestet, ob im Rahmen einer Medikamentenrepositionierung das Malariamittel Primaquin bzw. auch weitere Malariamedikamente über eine HSP90 Inhibierung Wirkungen auf Mammakarzinomzellen haben könnten. Im Folgenden ist daher kurz eine Einführung in die Malariaerkrankung und ihre medikamentöse Behandlung gegeben.

## **1.2 Die Malariaerkrankung**

Malaria ist eine durch Plasmodien hervorgerufene Protozoeninfektion. Innerhalb der Gattung der Plasmodien existieren rund 172 verschiedene Spezies, von denen vier den Menschen infizieren, nämlich *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* (Baird 2005). Zwei der menschlichen Malariaerreger, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, bilden ruhende Leberstadien (Hypnozoiten) aus und können somit ein Rezidiv oder ein verzögertes Ausbrechen der Malaria 16 Tage bis hin zu vielen Jahren nach der Primärinfektion hervorrufen (Baird and Hoffman 2004).

Tab 1. gibt einen Überblick über derzeit eingesetzte Malariamedikamente. Dabei sind die Medikamente entsprechend ihrer Anwendung den unterschiedlichen Malariaformen zugeordnet, sowie Handelsnamen und Dosierschemata angegeben.

-Einleitung-

| <b>Malariaform</b>                              | <b>Medikament</b>   | <b>Dosierung für Erwachsene</b>   |
|---|---|---|
| Unkomplizierte Malaria tropica (Pl. falciparum) | Atovaquon/ Proguanil (Malarone®)<br><br>Artemether/ Lumefantrin (Riamet®)<br><br>Dihydroartemisin/ Piperaquin (Euratesim®)        | Atovaquon 1000 mg + Proguanil 400 mg 1x/Tag über 3 Tage<br><br>2x 80 mg/ 2x 480 mg Artemether-Lumefantrine über 3 Tage<br><br>4x 40 mg/ 4x 320 mg Dihydroartemisin/Piperaquin über 3 Tage   |
| Malaria tertiana (Pl. vivax/ Pl. ovale)         | Atovaquon/ Proguanil (Malarone®)<br>Artemether/ Lumefantrin (Riamet®)<br><br>Anschlussbehandlung mit Primaquin (Primaquine® (NL)) | Siehe unkomplizierte Malaria tropica<br><br><br>0,25- 0,5 mg/ kg KG/ Tag über 14 Tage   |
| Malaria quartana (Pl. malariae)                 | Chloroquin (Resochin®)  | 10 mg/kg KG bei Therapiebeginn, 5 mg/kg KG nach 6, 24, 48 h.  |
| Komplizierte Malaria tropica (Pl. falciparum)   | 1. Wahl: Artesunat i.v.<br><br><br><br><br><br>2.Wahl: Chinin i.v. + Doxycyclin/ Clindamycin                                      | 2,4 mg/ kg KG als Bolus über 5 Min bei Aufnahme, nach 12, 24, 48, 72 h. Orale Anschlusstherapie: Atovaquon/ Proguanil<br><br>In üblicher Dosierung<br><br>Loading dose 20 mg Chininhydrochlorod/ kg KG über 4 h p.i. Erhaltungsdosis 10 mg/kg KG über 4 h p.i. alle 8 h |

**Tabelle 1: Überblick über Malariaformen und derzeit eingesetzte Malariamedikamente mit jeweiliger Dosierung.** (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria, Stand 2015)

Die WHO definiert eine komplizierte Malaria tropica durch den klinischen oder laborchemischen Nachweis vitaler Organdysfunktionen (Management of severe malaria- a practical handbook, WHO 2013).

### 1.2.1 Primaquin als Malariamedikament

Primaquin, als Hauptvertreter der Klasse der 8-Aminoquinoline, gilt seit mehr als vierzig Jahren als das Medikament der Wahl zur Therapie von *Plasmodium vivax* und *Pl. ovale* Malariainfektionen, weil es als einziges Malariamedikament gegen ruhende Leberstadien (Hypnozoiten) dieser Parasiten wirksam ist und so ein Malariarezidiv verhindern kann (Baird and Hoffman 2004). Der Vermehrungszyklus der Plasmodien und die Wirkorte von Primaquin sind in Abb. 1 dargestellt.

Primaquin wurde erstmals 1946 in den USA synthetisiert und zur Behandlung der Malaria amerikanischer Soldaten im Korea Krieg eingesetzt. Es ist gegen alle den Menschen infizierende Plasmodienarten wirksam und wird zur Bekämpfung der Malariainfektion an verschiedenen Fronten eingesetzt (Vale et al. 2009):

1. Zur Primärprophylaxe: Primaquin zerstört Gewebeschizonten aller Plasmodienarten in der Leber, bevor sie die Erythrozyten erreichen und verhindert dadurch die primäre Parasitämie. Es wird eine tägliche Dosis von 30 mg empfohlen, die einen Tag vor Reiseantritt bis sieben Tage nach Ende oral eingenommen wird (Hill et al. 2006).
2. Als vorbeugende Rezidivprophylaxe oder Terminalprohylaxe (PART= presumptive anti-relapse therapy): Vorbeugung eines Rezidivs oder einer spät einsetzenden Malaria bei Personen mit starker Exposition gegenüber *Pl. vivax* oder *Pl. ovale* durch Zerstörung der Hypnozoiten in der Leber. Empfohlen wird ein zweiwöchiges Therapieregime von 30 mg pro Tag (Hill et al. 2006).
3. Als Radikalkur: Vollständige Ausheilung einer symptomatischen *Plasmodium vivax* bzw. *ovale* Infektion durch Verhinderung von Rezidiven auf Grund von Hypnozoiten. Es werden 30 mg Primaquin täglich für zwei Wochen in Kombination mit einem Blutschizontozid, z.B. Chloroquin, empfohlen (Hill et al. 2006).
4. Übertragungsstop: Verhinderung einer weiteren Ausbreitung der Malariainfektion in Endemiegebieten durch gametozide (die Geschlechtsformen schädigende) Wirkung und dadurch Übertragungsstop vom Menschen auf die Mücke (Baird 2005).
5. Zur Verhinderung der Ausbreitung von Resistenzen gegenüber Blutschizontoziden: Einmalgabe von 45 mg Primaquin in Kombination mit Blutschizontoziden, z.B. Chloroquin, soll durch gametozide Wirkung die Ausbreitung von multiresistenten *Pl. falciparum* Stämmen gegenüber Blutschizontoziden verhindern (Peters 1999).

Da die antiinfektive Wirkung von Primaquin nur auf die extraerythrozytären Stadien der Plasmodien begrenzt ist und keine Blutstadien der Erreger zerstört werden, sollte Primaquin

#### -Einleitung-

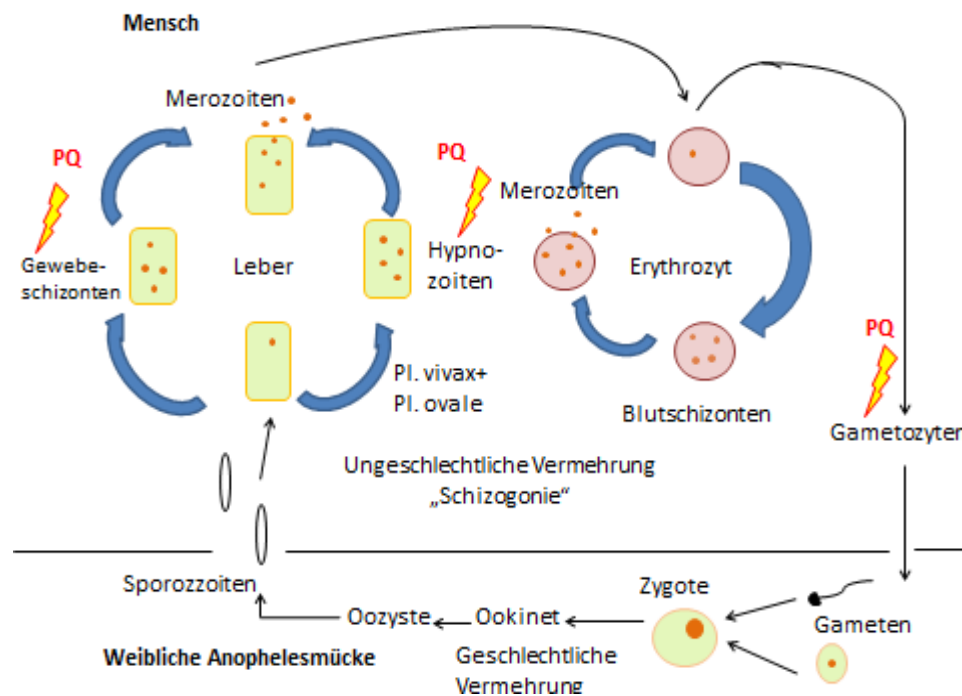
nicht zur Monotherapie, sondern immer in Kombination mit einem Blutschizontozid, wie z.B. Chloroquin, kombiniert werden (Baird and Hoffman 2004).

Der exakte Wirkmechanismus der 8-Aminoquinoline auf die unterschiedlichen Lebensstadien der Plasmodien ist bis heute nicht vollständig geklärt (Vale et al. 2009).

Allerdings scheint die Biotransformation von Primaquin sowohl für die antiinfektive Wirkung, als auch für die Toxizität als Nebenwirkung eine wesentliche Rolle zu spielen. Die wahrscheinlichste Theorie für die antiinfektive Wirkung ist die Bildung von Primaquin-Metaboliten, die auf Grund ihrer Fähigkeit zu Redox- Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden und oxidativen Stress in den infizierten Zellen auslösen (Tekwani and Walker 2006).

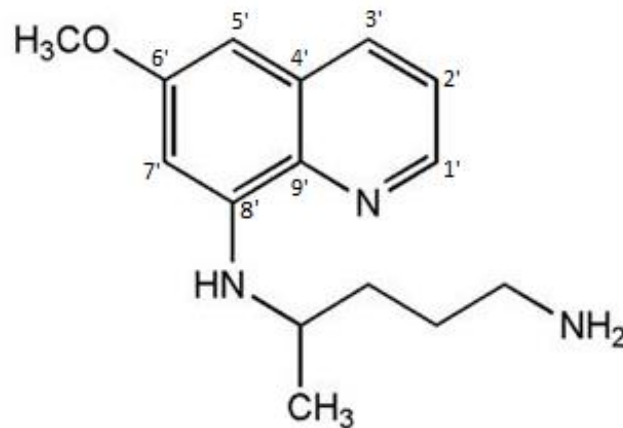
Neben der Malariatherapie wird Primaquin in Kombination mit dem Antibiotikum Clindamycin auch zur Behandlung von *Pneumocystis jirovecii* Pneumonien eingesetzt, eine häufige opportunistische Infektion bei AIDS-Patienten (Toma et al. 1998).





**Abbildung 1: Plasmodien-Vermehrungszyklus und Wirkorte von Primaquin.** Plasmodien werden durch den Stich der weiblichen Anophelesmücke auf den Menschen übertragen. Als Sporozoiten vorliegende Plasmodien vermehren sich zunächst ungeschlechtlich in der Leber und reifen zu exoerythrozytären Geweschizonten heran, aus denen sich Merozoiten entwickeln, die in die Blutbahn gelangen und Erythrozyten befallen. Aus erythrozytären Blutschizonten entstehen erneut Merozoiten, die durch Ruptur der Erythrozyten freigesetzt werden und einen Fieberschub auslösen. Merozoiten befallen weitere Erythrozyten, wandeln sich zu einem geringen Teil auch in Gametozyten um, die sich durch einen weiteren Stich der Anophelesmücke in ihr geschlechtlich fortpflanzen. Plasmodium vivax und ovale bilden ruhende Leberstadien (Hypnozoiten), die sich verzögert zu Geweschizonten entwickeln und dadurch Rezidive auslösen können (modifiziert nach Karow und Lang 2014 p.827).

### 1.2.2 Der Primaquin Metabolismus



**Abbildung 2:** Strukturformel von Primaquin.

Primaquin wird nach oraler Gabe schnell aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und reichert sich in Leber, Lunge, Gehirn, Herz und Skelettmuskulatur an (Vale et al. 2009). Die maximale Plasmakonzentration wird nach 2-3 Stunden erreicht und die Elimination erfolgt vor allem hepatisch mit einer kurzen Plasmahalbwertszeit von 3-8 Stunden (Nair et al. 2012). Die kurze Plasmahalbwertszeit erfordert eine häufige Gabe des Medikaments, wodurch Nebenwirkungen verstärkt werden können (Vale et al. 2009). Der Primaquin-Metabolismus umfasst eine Reihe hepatischer Enzyme des Cytochrom-P450-Systems sowie Monoaminoxidasen (Constantino et al. 1999; Pybus et al. 2012).

Der Großteil des Medikaments wird in einer CytochromP450-unabhängigen Reaktion über das Enzym Monoaminoxidase A (MAO-A) zu Primaquin-Aldehyd deaminiert, aus dem schließlich der Hauptplasmametabolit Carboxyprimaquin entsteht. Carboxyprimaquin weist weder eine antiinfektive noch eine toxische Wirkung auf (Constantino et al. 1999). Ein geringer Anteil wird über CYP450-Enzyme, vor allem CYP2D6, metabolisiert, wobei durch Hydroxylierungen der Aminogruppe und am Quinolinring redox-aktive Metabolite entstehen, die freie Radikale, Wasserstoffperoxid und letztendlich Methämoglobin bilden (Fletcher et al. 1988; Pybus et al. 2012).

### 1.2.3 Primaquin Nebenwirkungen

Als Nebenwirkungen werden gastrointestinale Beschwerden, wie Bauchkrämpfe, Übelkeit und Erbrechen beschrieben, die besonders bei Einnahme auf nüchternen Magen auftreten. Ansonsten ist Primaquin ein gut verträgliches Medikament (Taylor and White 2004).

Die Hämotoxizität ist eine seit langem bekannte und dosislimitierende Nebenwirkung, die den klinischen Nutzen von Primaquin, trotz seines unverzichtbaren Einsatzes in der Therapie von *Plasmodium vivax* – und ovale Infektionen, einschränkt. Besonders bei Patienten mit einem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, eine X-chromosomal-rezessive Erbkrankheit, die gehäuft bei afrikanischen Männern zu finden ist, kann Primaquin schwere Nebenwirkungen in Form hämolytischer Anämien und Methämoglobinämien verursachen. Dieser genetische Defekt muss deshalb vor Verabreichung des Medikaments ausgeschlossen werden (Taylor and White 2004; Hill et al. 2006). Personen mit diesem Enzymmangel sind besonders gefährdet, da sie nicht genügend NADPH zur Regeneration von Glutathion generieren können und somit einen verminderten antioxidativen Schutz gegenüber der durch Primaquin induzierten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aufweisen (Bowman et al. 2005a).

Nicht die Originalsubstanz Primaquin, sondern seine Metabolite sind demnach Ursache der Hämotoxizität, indem sie im Rahmen von Redox-Reaktionen Methämoglobin und ROS bilden, die oxidativen Stress in Erythrozyten induzieren (Fletcher et al. 1988; Bowman et al. 2004). Insbesondere Hydroxylierungen an Position 5 des Quinolinrings sind dafür bekannt redox-aktive Phenole wie 5-Hydroxyprimaquin zu bilden (Fletcher et al. 1988). Die hämolytische Wirkung von 5-Hydroxyprimaquin besteht in einer Schädigung erythrozytärer Zytoskelettproteine durch Hämoglobinaddukte. Oxidativ denaturierte Hämoglobinmoleküle sind über Disulfidbrücken mit Proteinen an der Innenseite des Membranskeletts verbunden (Heinz-Körper) (Fletcher et al. 1988; Bowman et al. 2005b) und bewirken eine vorzeitige Entfernung dieser veränderten Erythrozyten aus der Blutzirkulation durch Makrophagen in der Milz (Bowman et al. 2005a).

6-Methoxy-8-Aminoquinolin (6-MAQ) entsteht durch N-Dealkylierung aus Primaquin (Bolchoz et al. 2001). Durch weitere Hydroxylierung der Aminogruppe entsteht schließlich der Metabolit 6-Methoxy-8-N-Hydroxy-Aminoquinolin (6-MAQ-NOH), der auf Grund seiner Fähigkeit zur Lipidoxidation ebenfalls hämolytisch wirksam ist (Bolchoz et al. 2002).

Methämoglobin entsteht durch Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  des Oxyhämoglobins zu  $\text{Fe}^{3+}$  (Percy et al. 2005). Unter normalen Bedingungen macht Methämoglobin nur 1-2 % des Gesamthämoglobins aus, da durch Autooxidation gebildetes  $\text{Fe}^{3+}$  durch antioxidative Enzymsysteme wie NADH- und NADPH-Reduktasen wieder reduziert wird (Ganesan et al. 2009). Die tägliche Einnahme von Primaquin in therapeutischen und prophylaktischen Dosen erhöht zwar die Methämoglobinkonzentration, allerdings werden Zyanosen bei Menschen mit normalen antioxidativen Schutzsystemen nur selten beobachtet (Taylor and White 2004).

### **1.3 Malariamedikamente in der Krebstherapie**

Neben ihrer Anwendung in der Malariatherapie sind für einige Malariamedikamente bereits antitumorale Wirkungen beschrieben worden. Die antitumoralen Eigenschaften von

Artemisinin und Chloroquin sind derzeit am besten untersucht und werden im Folgenden näher erläutert.

### **1.3.1 Chloroquin**

Das 4-Aminoquinolin Chloroquin wird seit vielen Jahrzehnten zur Therapie und Prophylaxe der Malaria eingesetzt (Wiesner et al. 2003). Auf Grund seiner immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkung findet es auch in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (Augustijns et al. 1992), Lupus erythematoses (Meinão et al. 1996) und Amöbenhepatitis Anwendung (CONAN 1948). Die antiinfektive Wirkung von Chloroquin ist auf intraerythrozytäre Plasmodienstadien begrenzt, die aktiv Hämoglobin abbauen und wird daher als blutschizontozid bezeichnet (Slater 1993).

Als schwache Base reichert sich Chloroquin in den Fressvakuolen der Plasmodien innerhalb der Erythrozyten an, wird dort protoniert und erhöht deren pH-Wert. Dadurch wird einerseits die Funktion lysosomaler Enzyme beeinträchtigt, was in einem Mangel an Aminosäuren resultiert. Zusätzlich verhindert Chloroquin die Polymerisation der Hämgruppe zum kristallinen Malariapigment (Hämozoin), was sich toxisch auf die Plasmodien auswirkt (Slater 1993; Foley and Tilley 1998). Auf Grund seiner lysosomotropen Eigenschaft kann Chloroquin Autophagie in Zellen inhibieren und erweckte deshalb als Medikament auch zur Therapie weiterer Erkrankungen Interesse, unter anderem in der Therapie von Krebs (Solomon and Lee 2009; Janku et al. 2011).

Autophagie (aus dem Griechischen „sich selbst essen“) ist ein evolutionär konservierter kataboler Prozess, bei dem intrazelluläre Bestandteile, wie gealterte Organellen, denaturierte oder aggregierte Proteine abgebaut werden (Yang and Klionsky 2010). Die abzubauenen Biomoleküle werden zunächst von einem doppelmembranigen Vesikel umgeben, dem Autophagosom. Dieses Autophagosom verschmilzt mit Lysosomen, wodurch das Autolysosom entsteht, in dessen saurem Milieu der Abbau durch lysosomale Enzyme erfolgt. Am Ende dieses Prozesses werden Aminosäuren, Fettsäuren, Zuckermoleküle und Nukleotide in das Zytosol freigesetzt, die dort entweder zur Neusynthese von Biomolekülen oder als Energiequelle verwendet werden. (Glick et al. 2010; Mizushima and Komatsu 2011). In geringem Ausmaß findet Autophagie in allen Zellen statt, um potentiell schädliche Proteinaggregate oder geschädigte Zellorganellen zu entfernen und die Homöostase aufrechtzuerhalten (Macintosh and Ryan 2013).

In Situationen, die metabolischen Stress für die Zelle darstellen, wie z.B. Nährstoffmangel, Mangel an Wachstumsfaktoren, Hypoxie und saurer pH-Wert, wird Autophagie verstärkt induziert, um vorübergehend Energie bereitzustellen und das Zellüberleben zu schützen. Viele dieser metabolischen Situationen sind in Tumoren anzutreffen und Autophagie stellt damit einen Schutzmechanismus für Tumorzellen dar. Andererseits kann Autophagie auch zum

Zelltod führen, wenn z.B. essentielle zytosolische Bestandteile abgebaut werden (Macintosh and Ryan 2013).

In Abhängigkeit von weiteren Kontextfaktoren, wie dem Tumorstadium und Ursprungsgewebe kann Autophagie in Krebszellen sowohl tumorfördernde, als auch tumorsuppressive Effekte haben (Marx 2006; Kimmelman 2011; Macintosh and Ryan 2013). Auf der Basis, dass Tumorzellen Autophagie- abhängig sind, um metabolischem Zellstress, z.B. dem Einfluss von Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung widerstehen zu können, und dass Autophagie in vielen Tumorzellen verstärkt stattfindet, stellen Autophagie-Inhibitoren eine Möglichkeit dar, Krebszellen für Chemotherapeutika und Strahlentherapie zu sensibilisieren (Mancias and Kimmelman 2011; Townsend et al. 2012). Zusätzlich spielt Autophagie eine wichtige Rolle in der Resistenzentwicklung von Tumoren. Einige Chemotherapeutika, z.B. mTOR-Inhibitoren (Temozolomid) oder Tyrosinkinase-Inhibitoren (Imatinib) aktivieren Autophagie in Tumorzellen, wodurch diese insensitiv werden. Der Einsatz von Chemotherapeutika in Kombination mit Autophagie-Inhibitoren stellt somit eine Möglichkeit dar, Resistenzen zu minimieren (Bellodi et al. 2009; Xie et al. 2013).

Die am häufigsten verwendeten Autophagie- Inhibitoren, Chloroquin und Hydroxychloroquin, erhöhen den pH-Wert in den Lysosomen und blockieren damit den Abbau des Autophagosomen-Inhalts, was zur Akkumulation von Autophagie-Vesikeln und Zellstress führt und letztendlich zur Induktion von Apoptose (Egger et al. 2013). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Chloroquin in diversen Tumorarten zum Zelltod führte, z.B. in Brustkrebs (Rahim and Strobl 2009), Kolonkarzinomen (Zheng et al. 2009), Bronchialkarzinomen (Fan et al. 2006), Glioblastomen (Munshi 2009) und Melanomen (Egger et al. 2013). Auf Grund des gut verstandenen molekularen Mechanismus als Autophagie- Inhibitor, den bekannten pharmakologischen Eigenschaften und dem Fehlen gravierender Nebenwirkungen, wird Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin derzeit in diversen klinischen Studien in Kombination mit anderen Krebsmedikamenten eingesetzt (Solomon and Lee 2009). Siehe auch <http://clinicaltrials.gov>.

Neben seiner sensibilisierenden Wirkung auf Tumorzellen, sensibilisiert Chloroquin jedoch auch normale Zellen gegenüber Chemotherapeutika. In Zellen des proximalen Nierentubulus stellt Autophagie einen wichtigen Schutzmechanismus gegenüber akutem Nierenversagen dar. Der Einsatz von Chloroquin kann somit die nephrotoxische Wirkung vieler Chemotherapeutika, wie z.B. Cisplatin verstärken (Kimura et al. 2013). Desweiteren ist die Wirkung von Chloroquin und anderen Inhibitoren nicht autophagiespezifisch, wodurch weitere zelluläre Funktionen beeinträchtigt werden können, z.B. die Lysosomenfunktion und Endozytose in normalen Zellen (Cheong et al. 2012).

### 1.3.2 Artemisinin

---

Der Naturstoff Artemisinin (Qinghaosu) stammt aus der chinesischen Pflanze *Artemisia annua* L. und wird seit mehreren tausend Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen eingesetzt, unter anderem zur Behandlung von Fieber (Efferth 2007). 1972 wurde Artemisinin erstmals als wirksame Substanz für die Malariatherapie entdeckt (Li and Wu 1998). Artemisinin und seine Derivate Artesunat, Artemether, Arteether und Dihydroartemisinin sind heute unverzichtbare Malariamedikamente, insbesondere zur Behandlung multiresistenter *Pl. falciparum* Stämme (Price et al. 1998) und zur Behandlung von Malariainfektionen bei Kindern, da sie sehr gut verträglich sind (Dhingra et al. 1999; Meshnick 2002; Wiesner et al. 2003).

Entscheidend für die antiinfektive Wirkung der Artemisinin-derivate ist ihre Endoperoxidbrücke, die durch eine Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) vermittelte Reaktion reduktiv gespalten wird (Wiesner et al. 2003). Dabei entstehen freie Radikale, die einerseits die Membranen der Fressvakuolen schädigen mit nachfolgender Autodigestion, andererseits durch Alkylierung plasmodienspezifischer Malariaproteine die Parasiten abtöten (Asawamahasakda et al. 1994; O'Neill and Posner 2004). Plasmodien bauen in ihren Fressvakuolen Hämoglobin ab und besitzen deshalb einen hohen Anteil an Häm-Eisen, was die Spaltung der Endoperoxidbrücke und Aktivierung von Artemisinin in infizierten Erythrozyten begünstigt (Nakase et al. 2008).

Neben der gut erforschten Wirkung als Malariamedikament konnten in den 90er Jahren auch antitumorale Wirkungen für Artemisinin nachgewiesen werden (Woerdenbag et al. 1993; Lai and Singh 1995; Efferth et al. 2001). Artemisinin und seine Derivate beeinflussen zahlreiche verschiedene molekulare Mechanismen in Tumorzellen, die das Zellwachstum regulieren. Sie induzieren Apoptose in Krebszellen (Efferth et al. 1996; Wang et al. 2002; Efferth et al. 2003), arretieren den Zellzyklus am G1-/S-Übergang durch verminderte Expression von CDC25A (Efferth et al. 2003) und induzieren oxidativen Stress mit der Schädigung von Zellproteinen- und Lipiden als Folge (Efferth 2005).

Die Bildung neuer Blutgefäße ist entscheidend für das Tumorwachstum und die Metastasierung. (Chen et al. 2004) und (Dell'Eva et al. 2004) konnten nachweisen, dass Artemisinin-derivate die Angiogenese durch eine verminderte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und VEGF-Rezeptoren hemmen, sowie das Tumorwachstum von stark vaskularisierten Kaposisarkomen. Neuere Untersuchungen ergaben außerdem genotoxische Effekte in Form oxidativer DNA-Schäden und DNA-Doppelstrangbrüchen (Berdelle et al. 2011).

In vitro Studien konnten antitumorale Wirkungen der Artemisinin-derivate an zahlreichen humanen Krebszelllinien nachweisen. Unter anderem für Mamma-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinomzellen, Glioblastom-, Leukämie-, Melanom- und Bronchialkarzinomzellen (Efferth et al. 1996; Sadava et al. 2002; Efferth et al. 2004b; Chen et al. 2009; Morrissey et al. 2010; Hamacher-Brady et al. 2011; Lu et al. 2011; Cabello et al. 2012). Artemisinin muss für seine toxische Wirkung erst durch eine Reaktion mit Eisen aktiviert werden (Dhingra et al.

1999; Wiesner et al. 2003). Da Krebszellen auf Grund ihrer erhöhten Zellteilungsrate verstärkt Eisen aufnehmen und vermehrt Transferrinrezeptoren an der Zelloberfläche exprimieren, ist die zytotoxische Wirkung von Artemisinin selektiv für Tumorzellen (Reizenstein 1991; Singh and Lai 2001; Lai et al. 2005; Nakase et al. 2008).

Die Toxizität gegenüber Tumorzellen lässt sich durch einen Anstieg der intrazellulären Eisenkonzentration, z.B. durch Kombination von Artemisinin mit Holotransferrin oder (Fe<sup>2+</sup>)-Glycin-Sulfat (Ferrosanol®), weiter verstärken (Efferth et al. 2004a). Auch in vivo Untersuchungen an Tiermodellen konnten eine Wachstumshemmung, unter anderem von Fibrosarkomen, Brustkrebs und Kaposisarkomen, durch Artemisinininderivate belegen, die jedoch den Einsatz hoher Dosen erforderten (Moore et al. 1995; Dell'Eva et al. 2004; Lai and Singh 2006). Zusätzlich existieren klinische Fallberichte zur erfolgreichen Therapie von Larynxkarzinomen und metastasierten Aderhautmelanomen mit Artesunat in Kombination mit dem Standard-Chemotherapie-Regime (Singh and Verma 2002; Berger et al. 2005).

Anhand der oben beschriebenen Beispiele wird ersichtlich, dass Malariamedikamente auch für die Anwendung in der Krebstherapie ein großes Potential darstellen. Auf Grund ihrer bereits bekannten Nebenwirkungen und pharmakodynamischen Eigenschaften könnte die Entwicklung neuer Medikamente für die Onkotherapie deutlich beschleunigt werden.

Auch für Primaquin sind bereits antiproliferative Wirkungen auf Brustkrebszellen, sowie chemosensibilisierende Effekte in Kombination mit Mitosehemmstoffen beschrieben worden (Fernandes et al. 2009; Kim et al. 2013). Allerdings ist der molekularbiologische Mechanismus weitestgehend unerforscht. Die vorliegende Arbeit soll daher zum besseren Verständnis der antitumoralen Wirkung von Primaquin speziell an Brustkrebszellen beitragen.

## **1.4 Oxidativer Stress**

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Induktion von oxidativem Stress in Tumorzellen und seiner Bildung als Nebenprodukt des Cytochrom P450-Metabolismus. Deshalb soll an dieser Stelle die Herkunft und Auswirkung von oxidativem Stress auf die Zelle, sowie die wichtigsten antioxidativen Schutzmechanismen erläutert werden.

Von Sauerstoff oder Stickstoff abgeleitete Radikale (ROS= reaktive Sauerstoffspezies, RNS= reaktive Stickstoffspezies) entstehen im Rahmen des Zellmetabolismus und können, abhängig von der Konzentration, sowohl günstige als auch schädigende Auswirkungen auf die Zelle haben (Valko et al. 2006).

Ein Ungleichgewicht zwischen vermehrter Bildung pro-oxidativer Stoffe oder mangelnder Entfernung durch Antioxidantien kann Gewebeschäden verursachen und zum Zelltod führen und wird als oxidativer Stress bezeichnet (Halliwell 1994).

Pro-oxidative Moleküle können in zwei Gruppen unterteilt werden:

1. Freie Radikale: Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxylradikal ( $OH\cdot$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO\cdot$ ), Peroxyl- ( $ROO\cdot$ ) und Alkoxyl- ( $RO\cdot$ ) radikale
2. Nicht-Radikale: Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Peroxynitrit ( $ONOOH$ ), Ozon ( $O_3$ ) und Hypochloridsäure ( $HClO$ ).

Freie Radikale besitzen mindestens ein unpaariges Elektron in ihrer Außenschale, was sie zu sehr reaktiven Molekülen macht, da sie versuchen durch Elektronenaufnahme- oder abgabe Stabilität zu erreichen (Betteridge 2000; Kohen and Nyska 2002).

Die meisten Biomoleküle (DNA, Lipide und Proteine) sind Nicht-Radikale. Die Reaktion freier Radikale mit solchen Nicht-Radikalen setzt eine Kaskade in Gang, bei der fortlaufend neue Radikale gebildet werden, die dann mit weiteren Makromolekülen reagieren können, wie z.B. bei der Lipidperoxidation (Betteridge 2000).

Neben exogenen Einflüssen, wie z.B.  $\gamma$ -Strahlung, UV-Strahlung, Luftverschmutzung, Medikamente, Toxine und Nahrungsbestandteile, werden ROS auch endogen gebildet, meist als Nebenprodukt biochemischer Prozesse (Kohen and Nyska 2002). Der Hauptanteil endogener ROS entsteht während der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette. Im Rahmen der ATP-Synthese fließen Elektronen von NADPH und Succinat über die Komplexe der Atmungskette, wo sie am Ende Sauerstoff zu Wasser reduzieren. Allerdings entweichen 1-3 % aller Elektronen dieser Elektronentransportkette bereits vorzeitig und reduzieren molekularen Sauerstoff, wodurch Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) entstehen (Valko et al. 2004; Murphy 2009).

Weitere Quellen endogener ROS-Bildung sind die Peroxisomen, in denen zahlreiche oxidative Vorgänge stattfinden und Wasserstoffperoxid entsteht (Fritz et al. 2007), die Xanthin-Oxidase, die den Abbau der Purine Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure katalysiert (Vorbach et al. 2003), das Endoplasmatische Retikulum, in dem Proteine durch oxidative Bildung von Disulfidbrücken posttranslational modifiziert werden (Gross et al. 2006), die membranständigen Monooxygenasen (Cytochrom P450) des endoplasmatischen Retikulums (Zangar et al. 2004), sowie der NADPH-Oxidase-Komplex an der Zellmembran (Babior et al. 2002).

Während viele ROS als Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen entstehen, gibt es auch zelluläre Enzyme, die aktiv Radikale bilden. Die NO-Synthase bildet aus L-Arginin L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO), das über Aktivierung der Guanylatzyklase den Gefäßtonus reguliert (Shaul 2002).

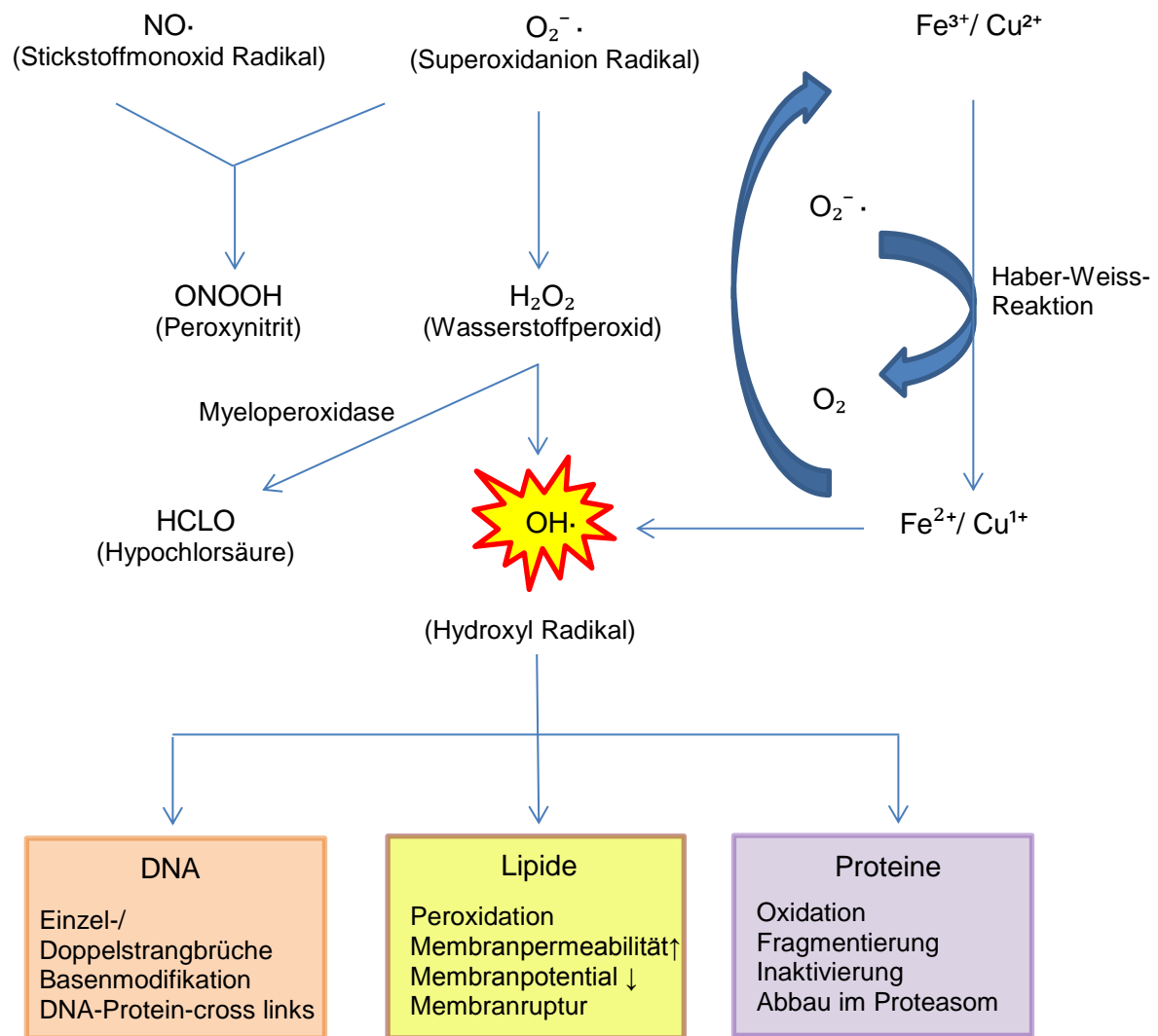
Aktivierte Entzündungszellen (Neutrophile und Monozyten) bilden große Mengen Superoxidanionen. Im Rahmen des „oxidativen burst“ nehmen sie verstärkt Sauerstoff auf.



### -Einleitung-

Dieser wird durch den NADPH-Oxidase-Komplex an der Zellmembran mit Hilfe von NADPH zu Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) reduziert, wodurch pathogene Keime abgetötet werden (Decoursey and Ligeti 2005). Die in Granulozyten enthaltene Myeloperoxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu Hypochlorsäure, ein ebenfalls starkes Oxidanz (Hawkins et al. 2001)

Zur besseren Anschaulichkeit sind ausgewählte Reaktionen, die zur Bildung von ROS beitragen, sowie deren Einfluss auf verschiedene Biomoleküle in Abb. 3 dargestellt.

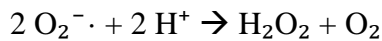


**Abbildung 3: Bildung reaktiver Spezies und durch sie induzierte oxidative Zellschäden.**  
(modifiziert nach Kohen und Nyska, 2002)

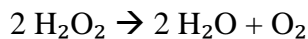
## -Einleitung-

Superoxidradikale entstehen, wenn Sauerstoff ein Elektron aufnimmt und sind selbst nur wenig reaktiv und schwache Oxidantien. Sie haben größere Bedeutung als Ausgangssubstanz bei der Bildung von Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid (Betteridge 2000).

Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Disproportionierung von zwei Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid. Dabei wird ein Superoxidradikal zu Sauerstoff oxidiert und das andere zu Wasserstoffperoxid reduziert (Kohen and Nyska 2002).



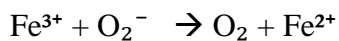
Wasserstoffperoxid kann durch eine weitere Disproportionierungsreaktion eliminiert werden, wobei zwei Moleküle Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff reduziert werden.



Wasserstoffperoxid kann entweder direkt Biomoleküle schädigen oder durch Reaktionen mit Übergangsmetallen noch reaktivere Hydroxylradikale bilden (Halliwell et al. 2000).

Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) sind starke Oxidanzien und die Sauerstoffradikale mit der höchsten Reaktivität. Da sie extrem kurzlebig und hochreaktiv sind, reagieren sie und schädigen Biomoleküle an dem Ort, wo sie gebildet werden (Halliwell and Gutteridge 2007).

Sie entstehen in vivo durch eine eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion, wobei aus weniger reaktiven Sauerstoffspezies, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen, hochreaktive Hydroxylradikale gebildet werden. Diese Reaktion verläuft in zwei Schritten und wird durch Übergangsmetalle, vor allem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und Kupfer ( $\text{Cu}^{1+}$ ), katalysiert (Kehrer 2000).



Übergangsmetalle besitzen ein ungepaartes Elektron und können so aus relativ stabilen oxidierenden Verbindungen hochreaktive Radikale erzeugen. Metalle, die an diesen Reaktionen teilnehmen sind an die Oberfläche von Proteinen, DNA und anderen Biomolekülen gebunden und dadurch für Redox-Reaktionen zugänglich (Halliwell and Gutteridge 1992).

ROS-induzierte Gewebeschäden können alle Biomoleküle der Zelle betreffen. Nukleinsäuren, Proteine und Lipide. Vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Membranphospholipide sind besonders anfällig für Oxidationen, was zu einer Zunahme der Membranpermeabilität und bis hin zur Ruptur führen kann (Betteridge 2000).

Interaktionen von ROS mit Proteinen können, neben Proteinfragmentierung- und aggregation, auch zu Veränderungen der Aminosäurereste (z.B. Carbonylierung) und der Tertiärstruktur führen, was sie für einen verstärkten Abbau durch das Proteasom anfällig macht (Stadtman and Oliver 1991). Diese Proteinschädigung geht mit Veränderungen zellulärer Funktionen einher, wie z.B. dem Verlust von Enzymaktivität oder der Energieproduktion (Davies 1987; Grune et al. 1997).

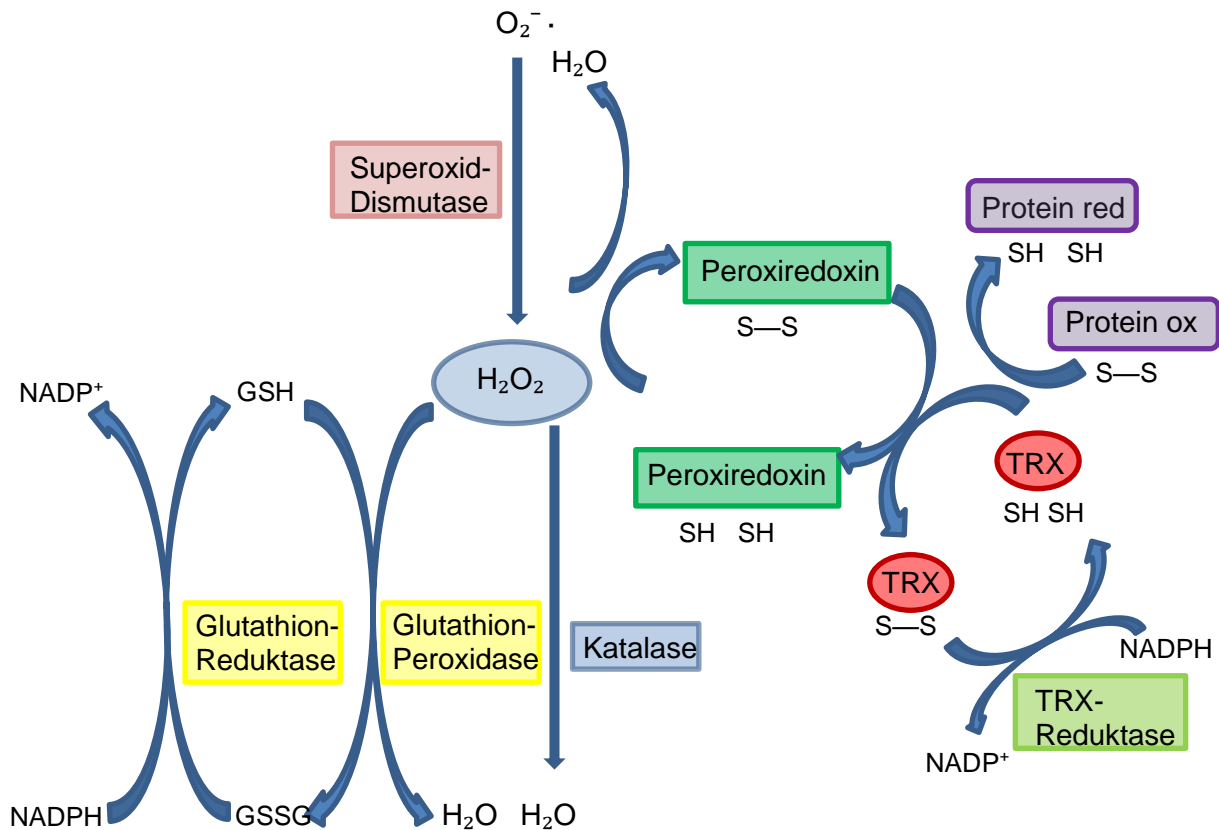
Insbesondere Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ) können DNA-Schäden unterschiedlichster Art verursachen. Diese umfassen Modifikationen von Purin- und Pyrimidinbasen, Einzel- und Doppelstrangbrüche, sowie Schädigungen der Desoxyribosemoleküle. Die bekannteste DNA-Veränderung durch oxidativen Stress ist die Bildung von 8-Oxoguanin, durch Oxidation von Guanin an Position C8 (Halliwell and Aruoma 1991). Die ständige Veränderung genetischen Materials, als Folge von oxidativem Stress, stellt einen wichtigen ersten Schritt in der Mutagenese und Karzinogenese dar (Valko et al. 2007).

#### **1.4.1 Antioxidantien**

Antioxidative Schutzmechanismen umfassen die enzymatische Entgiftung freier Radikale und reaktiver Spezies, die direkte Entfernung freier Radikale durch Elektronendonatoren und die Bindung pro-oxidativer Metalle ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{1+}$ ) an extrazelluläre Proteine wie Ferritin und Coeruloplasmin (Halliwell and Gutteridge 2007).

Die beiden wichtigsten intrazellulären Antioxidanz-Systeme, das Glutathion- und Thioredoxinsystem sind zur besseren Anschaulichkeit in Abb. 4 schematisch dargestellt.

-Einleitung-

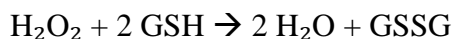


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Glutathion- und Thioredoxinsystems.** TRX = Thioredoxin, GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion. Die Grafik wurde anhand folgender Quellen erstellt (Karlenius and Tonissen 2010; Halliwell 1994).

Die Superoxiddismutase ist ein metallabhängiges Enzym und liegt im Zytosol, Zellkern (Cu-Zn-SOD), und in den Mitochondrien (Mn-SOD) vor. Es katalysiert die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (Halliwell 1994).

Katalase ist ein Häm-enthaltendes Enzym und kommt vor allem in den Peroxisomen vor. Es katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser (Halliwell and Gutteridge 2007).

Die selenabhängige Glutathion-Peroxidase befindet sich im Zytosol und in den Mitochondrien. Sie entfernt Wasserstoffperoxid und weitere organische Peroxide, z.B. Fettsäure- und Phospholipidhydroperoxide mit Hilfe von Glutathion als Cosubstrat durch Reduktion zu Wasser und kann somit die Kaskade der Lipidperoxidation beenden (Halliwell 1994; Efferth 2006).



Das Tripeptid Glutathion (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) ist das wichtigste zelluläre Antioxidanz. Es schützt vor oxidativem Stress als Cosubstrat entgiftender Enzyme, wie

Glutathion-Peroxidase, durch direkte Entfernung freier Radikale und durch die Regeneration weiterer Antioxidantien z.B. Vitamin C und Vitamin E (Masella et al. 2005).

Reduziertes Glutathion (GSH) wird an der Thiolgruppe des Cysteins oxidiert, wobei ein Elektron abgegeben wird und sich zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke zum oxidierten Glutathion (GSSG) zusammenlagern. Oxidiertes Glutathion wird anschließend durch die Glutathion-Reduktase mit Hilfe von NADPH wieder reduziert (vergleiche Abb. 4) (Rassow J 2008 p.662).

Das Thioredoxin-System besteht aus Thioredoxin, einem kleinen redox-aktiven Protein, Thioredoxin-Reduktase, Peroxiredoxin und NADPH. Neben seiner antioxidativen Funktion spielt es auch bei der Synthese von Desoxyribonukleotiden eine wichtige Rolle (Nordberg and Arnér 2001).

Thioredoxin besteht aus zwei Isoformen, Thioredoxin 1 im Zytoplasma und Thioredoxin 2 in den Mitochondrien. Es übt seine antioxidative Funktion entweder durch direktes Abfangen von Radikalen oder durch Reduktion oxidierten Disulfidbrücken in Proteinen aus (Powis and Montfort 2001). Die Cysteinständigen Thiolgruppen werden dabei selbst zum Disulfid oxidiert. Oxidiertes Thioredoxin wird anschließend durch die Thioredoxin-Reduktase mit Hilfe von NADPH wieder reduziert. Daneben ist das Thioredoxin-System auch an der Entgiftung von Wasserstoffperoxid beteiligt. Peroxiredoxin, eine Thioredoxin-abhängige Peroxidase, reduziert Wasserstoffperoxid und weitere Peroxide mit Hilfe der Thioredoxin-Thiolgruppen und wird anschließend durch Thioredoxin regeneriert (vergleiche Abb. 4) (Wood et al. 2003).

Nahrungsbestandteile wie Vitamin C, Vitamin E und  $\beta$ -Karotin tragen als Radikalfänger ebenfalls zum antioxidativen Schutz der Zelle bei. Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) und  $\beta$ -Karotin sind lipophile Moleküle. Sie wirken als Radikalfänger in der Zellmembran und beenden dadurch die Kettenreaktion der Lipidoxidation. Das  $\alpha$ -Tocopherol-Radikal wird anschließend durch Vitamin C reduziert (Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009). Das wasserlösliche Vitamin C (Ascorbinsäure) dient einerseits der Regeneration des  $\alpha$ -Tocopherol-Radikals, andererseits wirkt es als Radikalfänger im Zytoplasma und wird dabei selbst zum Semidehydroascorbat oxidiert, was wiederum mit Hilfe von NADPH oder Glutathion reduziert wird (Frei et al. 1990; Carr and Frei 1999).

#### **1.4.2 Das CytochromP450-System**

Die Superfamilie der CytochromP450-Enzyme (CYP450) besteht aus konstitutiven und induzierbaren Hämproteinen, die am Metabolismus einer Vielfalt von exogenen und endogenen Substraten beteiligt ist (Nelson et al. 1996). Die Namensgebung „Cytochrom P450“ stammt von Cytochrom = Hämprotein, P = Pigment und 450 = Wellenlänge von 450 nm als Absorptionsmaximum bei Bindung von Kohlenmonoxid (Omura T. and Sato R. 1964).

## -Einleitung-

Die Nomenklatur dieses Systems umfasst die Abkürzung CYP für Cytochrome, eine erste Ziffer zur Kennzeichnung der Genfamilie, ein darauf folgender Buchstabe zur Bezeichnung der Subfamilie und eine weitere Ziffer zur Kennzeichnung des individuellen Gens (Nelson, 1995). Bis heute sind 57 menschliche Cytochrome bekannt (Guengerich et al. 2005), die als wichtigste Phase-1-Enzyme an der Biotransformation von Medikamenten, Karzinogenen und weiteren Xenobiotika, sowie am Metabolismus endogener Substrate (Arachidonsäure, Steroidhormone und Fettsäuren) beteiligt sind (Bernhardt 2006).

Der Großteil der CYP450-Enzyme wird in der Leber exprimiert, wobei das Isoenzym CYP3A4 mit 30% den Hauptanteil ausmacht (Murray et al. 1988). Spezifische Isoformen befinden sich auch in extrahepatischen Geweben, wie Lunge (Anttila et al. 1997), Niere (Schuetz et al. 1992) und Dünndarm (Kaminsky and Fasco 1991).

Die an der Biotransformation von Medikamenten und Xenobiotika beteiligten Enzyme sind an der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums verankert, sodass sie auch als mikrosomale CYP450-Enzyme bezeichnet werden (Bernhardt 2006). Neben den ER-ständigen Enzymen sind einige CYP450-Isoformen auch an die innere Mitochondrienmembran gebunden und z.B. an der Biosynthese von Vitamin D und Steroidhormonen beteiligt (Bernhardt 2006).

CYP450-Enzyme katalysieren diverse Reaktionen, z.B. Hydroxylierungen, Oxygenierungen, Dealkylierungen, Epoxidierungen und Reduktionen (Guengerich 2001).

Als Monooxygenasen (mischfunktionelle Oxygenasen) katalysieren sie den Einbau von Sauerstoff in ein lipophiles Molekül. Monooxygenasen binden molekularen Sauerstoff, übertragen jedoch nur eines der beiden Sauerstoffatome auf das Substrat, wobei das andere zu Wasser reduziert wird.



Für diesen Reaktionszyklus werden 2 Elektronen benötigt, die von dem NADPH stammen und über das Flavoprotein, Cytochrom P450-Reduktase, übertragen werden. Das erste Elektron dient der Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  der Häm-Gruppe zu  $\text{Fe}^{2+}$ , welches nun molekularen Sauerstoff binden kann. Das zweite Elektron wird zur Aktivierung des Sauerstoffs benötigt (Denisov et al. 2005).

Die Biotransformation, die größtenteils in der Leber stattfindet, kann in zwei Phasen unterteilt werden. Während der Phase-1 (Umwandlungsreaktion) entsteht aus einem Ausgangsstoff durch Oxidation, Hydroxylierung oder Reduktion ein polarer Metabolit. Der aktivierte Metabolit wird dann in der Phase-2 (Konjugationsreaktion) mit Glukuronsäure, Glutathion, Schwefelsäure, oder Aminosäuren gekoppelt und somit für die Elimination wasserlöslich gemacht (Karow T 2014 p.43).

Meist werden Substrate durch CYP450-Enzyme inaktiviert (Entgiftung). Allerdings können Substrate durch diese Reaktion auch zum eigentlichen Schadstoff aktiviert werden (Giftung) oder das Ergebnis kann den eigentlichen Wirkstoff darstellen (Prodrug-Aktivierung) (Gonzalez and Gelboin 1994; Karow T 2014 p.43). Am Arzneistoffmetabolismus in der Leber sind hauptsächlich drei der Genfamilien (CYP1, CYP2, CYP3) beteiligt (Wrighton and Stevens 1992). CYP450-Enzyme in Leber und Darm reduzieren die Arzneistoffmenge, die den systemischen Blutkreislauf erreicht (First-pass-Effekt) (Efferth 2006). Die Expression und Aktivität Xenobiotika metabolisierender CYP450-Enzyme kann auf Grund genetischer Polymorphismen stark variieren, wodurch einerseits die Wirksamkeit des Pharmakons eingeschränkt sein kann („rapid metabolizer“), andererseits bei steigenden Plasmaspiegeln schwere Nebenwirkungen auftreten können („poor metabolizer“) (Guengerich 2006).

Cytochrom P450-Enzyme spielen auch in der Entwicklung von Tumoren eine entscheidende Rolle, da sie viele Karzinogene metabolisieren und dadurch sowohl aktivieren als auch entgiften können (Guengerich 1992; Gonzalez and Gelboin 1994). Daneben kann auch das Ansprechen von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst werden, wenn diese durch den Metabolismus aktiviert oder inaktiviert werden (Kivistö et al. 1995).

### **1.5 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des Malariamedikaments Primaquin auf Brustkrebszellen untersucht werden. Auf Grund von Hinweisen aus der Literatur soll überprüft werden, ob Primaquin ein möglicher HSP90-Inhibitor ist und damit in Form einer zielgerichteten Therapie in der Krebstherapie zum Einsatz kommen könnte.

Eine bekannte Nebenwirkung von Primaquin ist die Induktion von oxidativem Stress, der als Nebenprodukt in Form redox-aktiver Metabolite und Superoxidradikale im Rahmen der Biotransformation über CYP450-Enzyme entsteht. Die Arbeit untersuchte deshalb die folgenden Kernfragen:

- Was sind die zellmorphologischen und biochemischen Mechanismen einer potentiellen antitumoralen Wirkung von Primaquin auf Brustkrebszellen und inwiefern unterscheiden sich diese von der Wirkung des Chloroquins?
- Wie sieht das Genexpressionsmuster verschiedener CYP450-Isoenzyme in Mammakarzinomzelllinien aus und lassen sich diese Enzyme durch Primaquin induzieren?
- Inwiefern kann der antitumorale Effekt durch eine Kombination mit Inhibitoren des antioxidativen Systems, z.B. Auranofin, weiter verstärkt werden?

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Allgemein verwendete Materialien**

##### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- 6- Wellplatten, Nunclon Delta Surface (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- 96- Well-Platten (VWR, Ismaning)
- Aufbewahrungsgefäß, Falcon Conical Tube (50 ml) (Becton Dickinson, Belgien)
- ELISA Gerät, Universal Microplate Reader ELx 800 NB (Bio- Tek instruments, Bad Friedrichshall)
- Kühl- und Gefrierschrank, LIEBHERR Premium
- Kryoröhrchen, Cryo Tube™ Vials (1,8ml) (Nunc, Dänemark)
- Mikroskop, Zeiss Axiophot Fluoreszenz (Zeiss, Jena)
- Pipetten (100 µl, 200 µl, 2,5 µl) (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, SafeSeal- Tips premium (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Pipettierhelfer Accu-Jet (Brand, Wertheim)
- Reaktionsgefäß, Microcentrifuge Tubes (1,7 ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Serologische Pipette (5 ml, 10 ml) (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifuge, Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific GmbH, Roskilde, Dänemark)
- Zentrifugenröhrchen Eco (15 ml) (Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe)

##### **Reagenzien**

- Destilliertes Wasser (Noll, München)
- Di- Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- DMSO (Carl Roth und Co. KG GmbH, Karlsruhe)
- Ethanol >99,8 %, ROTIPURAN® (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- PBS, Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg (PAA Laboratories GmbH, Pasching)



### **2.1.2 Untersuchte Substanzen**

Alle untersuchten Substanzen wurden bei -20 °C gelagert und für die Durchführung der Experimente aufgetaut.

- Auranofin (Axxora, Lörrach) als Stammlösung von 2 mg/ml in DMSO
- Chloroquin (Sigma-Aldrich, München) als Stammlösung von 100 mM in DMSO
- Geldanamycin (Axxora, Lörrach) als Stammlösung von 10 µg/µl in DMSO
- N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich, München) als Stammlösung von 100 mM in PBS
- Primaquin (Sigma-Aldrich, München) als Stammlösung von 100 mM und 20 mM in DMSO
- Radicol (Axxora, Lörrach) als Stammlösung von 10 µg/µl in DMSO

### **2.1.3 Verwendete Materialien für die Zellkultur**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- µ- Angiogeneseslide für Sphäroide (Ibidi, Martinsried)
- Brutschrank, HERAccl 150 i CO2 Inkubator (Thermo Fisher Scientific GmbH, Roskilde, Dänemark)
- Matrigel, Geltrex™ LDEV-free reduced growth factor basement membrane matrix (Life technologies, Karlsruhe)
- Sterilwerkbank, Heraeus HERA safe® Lamina air flow (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau)
- Stickstofftank, Taylor- Wharton LS 750 (Tec-Lab, Königstein)
- Zellkulturflaschen, Falcon® Tissue culture flask, 50 ml, canted neck (Becton Dickinson, Le Pont De Claix)
- Zellkulturschalen (Corning®)

#### **Medien und Biochemikalien**

- Coomassie brilliant blue G- 250 (Sigma- Aldrich, München)
- Kälberserum, FBS (fetal bovine serum) Superior standardized (Biochrom AG, Berlin)
- MTT- Substanz (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) (Sigma-Aldrich, München)
- Nährmedium Dulbecco´s MEM with NaHCO<sub>3</sub>, with glucose, with glutamine (Biochrom AG, Berlin)
- Penicillin/ Streptomycin (100x) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
- Trypsin (Biochrom AG, Berlin)

### Zelllinien

Die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-453, T-47D, MDA-MB-231, MCF10A und HepG2 wurden über ATCC (LGC standards, Wesel) bezogen.

Die Zelllinie TC7 wurde über Dr. Monique Rousset, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris bezogen.

| <b>Zelllinie</b>  | <b>Charakteristika</b>  |
|---|---|
| <b>MCF- 7</b> (Michigan Cancer Foundation 7)<br>(ATCC® HTB-22™) | Humane Mammakarzinomzellen eines Adenokarzinoms der Brustdrüse. Die malignen Zellen stammen aus einem Pleuraerguss einer 69- jährigen Frau.             |
| <b>MDA-MB-453</b><br>(ATCC® HTB-131™)                           | Metastasierte Mammakarzinomzelllinie. Diese Zellen wurden aus einem malignen Perikarderguss einer 48- jährigen Frau gewonnen.                           |
| <b>T-47D</b><br>(ATCC® HTB-133™)                                | Humane Mammakarzinomzelllinie eines metastasierten duktales Mammakarzinoms. Die malignen Zellen stammen aus einem Pleuraerguss einer 54- jährigen Frau. |
| <b>MDA-MB-231</b><br>(ATCC® HTB-26™)                            | Humane Mammakarzinomzelllinie eines metastasierten Adenokarzinoms einer 51- jährigen Frau. Die malignen Zellen wurden aus einem Pleuraerguss gewonnen.  |
| <b>MCF10A</b><br>(ATCC® CRL-10317™)                             | Benigne Mammazelllinie einer fibrozystischen Mastopathie einer 36- jährigen Frau.   |
| <b>HepG2</b><br>(ATCC® HB-8065™)                                | Humane Leberzellkarzinomlinie eines hepatozellulären Karzinoms eines 15- jährigen männlichen Jugendlichen.  |
| <b>TC7</b>  | Klon der humanen Caco-2 Zelllinie eines kolorektalen Adenokarzinoms, der unter bestimmten Bedingungen zu Enterozyten differenziert.                     |

**Tabelle 2:** Verwendete Zelllinien

### **2.1.4 Verwendete Materialien für Zellfärbungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- Deckgläser, Menzel- Gläser 24 x 60 mm #1 (Gerhard Menzel, Braunschweig)
- Mikroskop, Zeiss Axiophot Fluoreszenz (Zeiss, Jena)
- Objektträger, Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Objektträger, 76x26x1 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen)

#### **Zellfarbstoffe**

Alle verwendeten Zellfarbstoffe wurden unter lichtgeschützten Bedingungen bei -20 °C gelagert.

- **Dihydroethidiumbromid** (Superoxide detection reagent) (Enzo life science) ist ein zellpermeabler Farbstoff, der spezifisch mit Superoxidradikalen reagiert und orange fluoresziert. Er wird zum Nachweis von Superoxidradikalen in lebenden Zellen eingesetzt.
- **Mito capture JC-1** (Mitochondrial apoptosis detection kit) (Enzo life science) (Stammlösung 5 mg/ml in DMSO/Ethanol) wurde mit Medium in einer Konzentration von 1:1000 verdünnt und zentrifugiert. JC-1 ist ein roter Farbstoff, der im Fluoreszenzmikroskop als Monomer grün und als Aggregat rot-orange fluoresziert, wenn er sich in der intakten Mitochondrienmembran anreichert und dort kristallisiert.
- **Monodansylcadaverin, MDC** (Sigma-Aldrich, München) (Stammlösung 1 mg/ml in DMSO) ist ein Farbstoff zum Nachweis von Autophagie in Zellen durch Akkumulation in den sauren Autophagie-Vakuolen. MDC wurde mit Medium in einer Konzentration von 1:1000 verdünnt.
- **Trypanblau** (0,4 %) (Sigma-Aldrich, München) ist ein Farbstoff, der selektiv von toten Zellen ohne intakte Zellmembran aufgenommen wird und als Anion im Zytosol an Proteine bindet. Auf Grund seiner Molekülgröße kann der Farbstoff die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren. Trypanblau wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.1.5 Verwendete Materialien für die Proteinbiochemie**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- Elektrophorese-/Blotting Apparatur, Mini Trans-Blot® Cell (BioRad Laboratories GmbH, München)
  - Elektrophoresestromquelle, Consort 1200V- 500mA E815 (Consort, Parklaan, Belgien)
  - Fiber-Pads, Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
  - Filterpapier, Mini Trans-Blot filter paper (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
  - Gelkassettenhalter, Mini Protean II electrophoresis cell (BioRad Laboratories, München)
-

## -Materialien und Methoden-

- Kanüle, Sterican® Einmalkanüle (B. Braun, Melsungen)
- Polyacrylamidgele, Roti® –PAGE Gradient (4-20%) (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- PVDF-Membran, Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Schüttler, Vibrax (Serono Diagnostics)
- Spritze (B. Braun, Melsungen)

### **Reagenzien und Puffer**

- 10x Tris/Glycin/SDS – Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München)
- 10x Tris/Glycin – Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Auftragspuffer, Roti-Load 1, reduzierend (4x konzentriert) (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- BCIP/ NBT Color development substrate (Promega GmbH, Mannheim)
- Blockingpuffer (4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid und 0,01% Tween®)
- Entwicklungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> zusammen mit 300 µl NBT und 150 µl BCIP)
- Gelelektrophorese Puffer (10x Tris/Glycin/SDS Puffer mit destilliertem Wasser als Konzentration von 1:10 verdünnt)
- Milchpulver, Blotting Grade (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Natriumazid (Sigma-Aldrich, München)
- Proteinmarker, peqGold Proteinmarker V (peqlab, Erlangen)
- RIPA- Puffer (10x konzentriert) (Sigma-Aldrich, München)
- Transferpuffer (10x Tris/Glycin Puffer mit destilliertem Wasser als Konzentration von 1:10 verdünnt)
- Tween® 20 (Carl Roth und Co. KG GmbH, Karlsruhe)

### **Primärantikörper**

- HSP90 antibody, #4874 (cell signaling technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- LC3B antibody, #2775 (Cell signaling technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- HER-2 antibody, #MS-325 (ThermoScientific, Germany)
- Glucocorticoide receptor antibody, #03922 (BD Biosciences, Heidelberg)
- HSF-1 antibody, #4356 (Cell signaling technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt)
- Histone H1 antibody, #sc-8030 (mouse) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

- Actin polyclonal antibody, # A 2066 (Sigma-Aldrich, München)

### **Sekundärantikörper**

- Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat anti-mouse IgG (Dianova, Hamburg)
- Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg)

## **2.1.6 Verwendete Materialien für die Molekularbiologie**

### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- Agarosegel, E-Gel® 2% with SYBR Safe™ (Invitrogen by Life technologies, Darmstadt)
- Spannungsquelle, Power Base™ für E-Gel (Invitrogen)
- Thermocycler, Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
- Universal Hood II (Biorad Laboratories) zur UV-Bestrahlung und Auswertung
- Zentrifuge, Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)

### **Reagenzien und Puffer**

- dNTP-Mix “Long Range” (peqlab, Erlangen)
- Nukleasefreies Wasser (Promega GmbH, Mannheim)
- Oligo dT (biomers.net)
- PCR Ladepuffer, 6x mass buffer (Promega GmbH, Mannheim)
- PCR Master Mix (2x) (Promega GmbH, Mannheim)
- Reverse Transkriptase, M-MLV RT 200 u/μl (Promega GmbH, Mannheim)
- Reverse Transkriptase Puffer, M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (Promega GmbH, Mannheim)
- RNA- Extraktions Kit, Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo research, Freiburg)
- RNase- Inhibitor, peqGOLD (peqlab, Erlangen)
- Trizol, peqGOLD TriFast™ (peqlab, Erlangen)

## Primer

| Gen     | Primersequenz<br>vorwärts (5'-3') | Primersequenz<br>rückwärts (5'-3') | PCR Produkt<br>(Basenpaare) |
|---------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| β-Aktin | GGAGAAGCTGTGCTACGTCG              | CGCTCAGGAGGAGCAATGAT               | 366                         |
| CYP 1A1 | AGACACAGTGATTGGCAGGTCAC           | CTGAACCTTAGACCACATAG               | 589                         |
| CYP 1B1 | CGTACCGGCCACTATCACTG              | GTCCAAGAATCGAGCTGGAT               | 385                         |
| CYP 2A6 | CATGGAGGCAGTGATCCACG              | GTCAATGTCCTTAGGTGACT               | 364                         |
| CYP 2B6 | GCCATACACAGAGGCAGTCATC            | GCAGGTCTCTCAGAGGCAG                | 545                         |
| CYP 2D6 | CCTCCTGCTCATGATCCTAC              | GAAGCTGAAGTGCTGCAGCA               | 448                         |
| CYP 2E1 | CAGCGGTTCATCACCCCTCGTG            | GTAACGTGGTGGGATACAGCC              | 384                         |
| CYP 3A4 | CCTATGATACTGTGCTACAG              | GGATGAAGCCCATCTTCATT               | 585                         |

**Tabelle 3:** Verwendete Primer. Alle Primer wurden über die Firma „biomers.net“ bestellt.

### 2.1.7 Verwendete Materialien für die Immunfluoreszenzmikroskopie

#### Geräte und Verbrauchsmaterial

- Deckgläser, Menzel- Gläser 24 x 60 mm #1 (Gerhard Menzel, Braunschweig)
- Einbettmedium, Vectashield Hard Set™ Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc. Axxora, Lörrach)
- Ethanol >99,8 %, ROTIPURAN® (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Zeiss-Axiophot Fluoreszenzmikroskop mit Filter für 525 nm Wellenlänge (Zeiss, Jena)
- Objektträger, 76x26x1 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen)

#### Primärantikörper

- Ki67 antibody, MIB-1 mouse anti-human #M7240 (Dako, Hamburg)

#### Sekundärantikörper

- Alexa Fluor 488-conjugated Affini Pure Goat anti-mouse IgG (Dianova, Hamburg)

### **2.1.8 Verwendete Materialien für FACS-Analysen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterial**

- Durchflusszytometer, Beckman Coulter® Epics XL-MCL™ flow cytometer (Beckman Coulter, München)

#### **Reagenzien**

- Annexin-PI-staining kit (BioCat, Heidelberg)
- ROS/ superoxide detection reagent (Enzo life sciences, Lörrach)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von Tumorzellen**

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tab. 2 (S. 26) genannten Zelllinien in einer Dauerkultur unter standardisierten Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 37 °C) kultiviert. Alle Zelllinien wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Medium mit 20 % Kälberserum, sowie Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Das Zellwachstum- und die Vitalität wurden täglich unter dem Lichtmikroskop beobachtet und gegebenenfalls das alte Medium durch frisches Medium ersetzt. Sobald eine Zellkonfluenz von 80 % erreicht war, wurde das Medium abpipettiert, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin versehen und für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinisierung diente dem Aufbrechen der Zell-Zell-Verbindungen der am Boden der Zellkulturflasche haftenden Zellen. Diese ließen sich anschließend durch sanftes Abschlagen leicht lösen und wurden in einer Konzentration von 1:10 mit Medium verdünnt und auf weitere Zellkulturflaschen verteilt. Für die Experimente wurden die Zellen auf 6-Well-Platten oder Objektträgern ausgesät (5x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kammer). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 h wurden die entsprechenden Chemikalien hinzugefügt (siehe Ergebnisse) und für weitere 24 h bzw. 48 h inkubiert. Das Arbeiten mit den Zelllinien erfolgte ausschließlich unter einer Lamina Air Flow Sterilwerkbank.

### **2.2.2 MTT- Zellvitalitätstest**

Mit dem MTT- Assay wurden die Überlebensraten der Zellen sowohl unter Zugabe von Primaquin als auch von Chloroquin analysiert. Die Zellen der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-453, T-47D, MDA-MB-231, MCF10A und TC7 wurden als Triplikate (je 5000 Zellen pro Well) in 96- Well- Platten angesetzt und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit Primaquin oder mit Chloroquin in

---

Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  behandelt und für 72 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die oben genannten Zelllinien ohne die Zugabe von Medikamenten ebenfalls inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde das Nährmedium der behandelten Zellen sowie der Negativkontrolle entfernt und durch 200  $\mu\text{l}$  frisches Medium pro Well ersetzt. Pro Well wurden 20  $\mu\text{l}$  MTT- Farbstoff (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid), in einer Konzentration von 5 mg/ ml, in PBS verdünnt hinzugegeben und für eine weitere Stunde unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der MTT- Farbstoff wird nur von metabolisch aktiven Zellen zu wasserunlöslichem, dunkelblauem Formazan umgesetzt. Die wasserunlöslichen Farbkristalle wurden in 100  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst und die Farbintensität photometrisch mittels ELISA- Reader bei 595 nm bestimmt.

### **2.2.3 Tumorsphäroide**

Für Untersuchungen an einer dreidimensionalen Zellkultur wurden Sphäroide generiert und anschließend die Wirkung der Medikamente Primaquin und Auranofin unter diesen Bedingungen analysiert.

Zur Vorbereitung der Experimente wurde extrazelluläres Matrigel auf einem Eisbad aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 9  $\mu\text{l}$  des flüssigen Matrigels gleichmäßig in die Wells eines  $\mu$ -Angiogenesis slides pipettiert. Das Matrigel gelierte bei Raumtemperatur, sodass es nach einer Stunde fest war und für die Experimente verwendet werden konnte. Für die Experimente wurden MCF-7 Zellen trypsinisiert und mit Medium verdünnt. Je 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden auf die mit Matrigel bedeckten Wells pipettiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zellkulturbedingungen inkubiert und die Formation der dreidimensionalen Sphäroide täglich unter einem Mikroskop kontrolliert. Nach ein bis zwei Tagen war die Größe der Sphäroide ausreichend, sodass Primaquin (10 $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ), Auranofin (1  $\mu\text{M}$ ) oder Primaquin (10  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit Auranofin (1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben werden konnte. Für die Kontrolle wurden keine Medikamente zugegeben, sondern nur das alte Medium durch frisches ersetzt. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Sphäroide mit Hilfe eines Zeiss-Axiophot-Mikroskops analysiert und bei 40-facher Vergrößerung fotografiert.

### **2.2.4 Klonassay**

Der Klonassay diente der optischen Darstellung des langfristigen wachstumshemmenden Effekts von Primaquin. Dafür wurden MCF-7- Zellen trypsinisiert, gleichmäßig auf 6- Well-Platten verteilt (500 Zellen pro Well) und unter Zellkulturbedingungen über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit niedrigen Primaquinkonzentrationen (2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ ) bebrütet. Das Zellwachstum wurde im Lichtmikroskop über mehrere Tage beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde das Nährmedium abpipettiert,

---



die Zellen für 2 Minuten in 80 % Ethanol fixiert und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau für 30 Minuten gefärbt. Um die Bildung von Kalkflecken zu vermeiden, wurden die 6- Well- Platten nach Entfernung des Farbstoffs mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und fotografiert.

### **2.2.5 Phasenkontrastmikroskopie und Zellfärbung**

Für die Fluoreszenzuntersuchungen wurden die Zellen der Linie MCF-7 trypsinisiert, in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit Medium verdünnt und auf einen 8-Kammer-Objektträger dünn angesetzt. Am folgenden Tag wurde Primaquin (in Konzentrationen von 20µM, 50µM) beziehungsweise Chloroquin (als Konzentration von 50 µM) bzw. Auranofin (in Konzentrationen von 0,5µM oder 1µM) dazugegeben. Dafür wurde die Stammlösung aufgetaut und in einem 1,8 ml Kryoröhrchen die jeweilige Konzentration hergestellt. Das Medium aus dem 8-Kammer-Chamberslide wurde vollständig abpipettiert und es wurden jeweils 200 µl der hergestellten Medikamentenkonzentrationen hinzugegeben. Die Zellen für die Kontrolle wurden nicht mit Medikamenten inkubiert, sondern nur das alte Medium durch frisches Medium, mit jeweils entsprechender Lösungsmittelkontrolle, ersetzt. Anschließend wurden die MCF-7 Zellen für 24 Stunden im Brutschrank mit den Medikamenten inkubiert.

Damit die 24 Stunden- und 48 Stundenexperimente gleichzeitig durchgeführt werden konnten, wurden die Zellen für das 48 Stundenexperiment bereits einen Tag früher als die übrigen Zellen mit den Medikamenten inkubiert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurde die Stammlösung der oben genannten Farbstoffe aufgetaut. JC-1 und MDC wurden in einer Konzentration von 1:1000, Dihydroethidiumbromid in einer Konzentration von 1:50 mit Medium verdünnt, geschüttelt und zentrifugiert. Das Medium der behandelten Zellen sowie der Kontrolle wurde entfernt und stattdessen 500 µl des verdünnten Zellfarbstoffs hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C für 20 Minuten mit dem Zellfarbstoff inkubiert. Für Experimente mit Dihydroethidiumbromid wurde das medikamentenenthaltende Medium nicht entfernt. Stattdessen wurden 20 µl des verdünnten Farbstoffs (Konzentration 1:50) zu den 200 µl des medikamentenenthaltenden Mediums hinzugegeben, damit auch hier eine Farbstoffendkonzentration von 1:1000 erreicht wurde, jedoch ohne das Medium mit den enthaltenen Superoxidradikalen zu entfernen. Die Zellen mit Dihydroethidiumbromid wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten von 20 Minuten bzw. 2 Stunden wurde das farbstoffenthaltende Medium der mit Medikamenten behandelten Zellen als auch der Kontrollen entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Der 8-Kammer-Trennsteg wurde vorsichtig vom Objektträger abgelöst, die Zellen auf dem Objektträger mit einem Deckglas bedeckt und lebend mit einem Zeiss- Axiophot Fluoreszenzmikroskop analysiert und bei 40-facher Vergrößerung fotografiert.

Zur Durchführung der Mitotracker-/Trypanblau- Cofärbung wurden die Zellen nach Entfernung des Mitotrackers zusätzlich für 2 Minuten mit 300 µl 0,4 % Trypanblau bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das weitere Vorgehen entsprach dem der anderen Farbstoffuntersuchungen.

### **2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die Zellen der Linie MCF-7 zunächst trypsinisiert, mit Medium verdünnt und auf Deckgläschen angesetzt. Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und stattdessen Primaquin-haltiges Medium (in einer Konzentration von 20 µM) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um die 48 Stunden Experimente am gleichen Tag auswerten zu können, wurde eine Zellfraktion bereits einen Tag vorher mit Medikamenten versehen. Nach der Inkubationszeit wurde das medikamentenenthaltende Medium vorsichtig abpipettiert und die behandelten Zellen sowie die Kontrollgruppe mit >99,8 % Ethanol für 5 Minuten fixiert. Durch waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen rehydratisiert, bevor der Ki67 Erstantikörper in einer Konzentration von 1:100 mit Medium verdünnt dazugegeben und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen und der Alexa Fluor 488-konjugierte Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:200 mit Medium verdünnt für eine weitere Stunde dazugegeben. Nach Entfernung des Zweitantikörpers wurden die Zellen erneut 3x 5 Minuten mit PBS sowie mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette auf einen Objektträger überführt, die Zellen mit einem Tropfen DAPI enthaltenden Einbettmedium (Vectashield) versehen und zwischen Objektträger und einem zweiten Deckglas eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskops sowohl ohne, als auch mit Immunfluoreszenz mit einem Filter von 525 nm Wellenlänge bei 40 facher Vergrößerung.

### **2.2.7 FACS- Analyse**

#### **2.2.7.1 Grundlagen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

FACS (Fluorescence activated cell sorting) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie zur quantitativen Analyse von Zellpopulationen, die nach ausgewählten Kriterien sortiert bzw. isoliert werden. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die zu bestimmenden Moleküle der Zellen werden durch Bindung an Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper oder eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs erfasst und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und beleuchtet. Die beleuchteten Zellen strahlen ein für das Fluorochrom charakteristisches Licht aus, das neben dem Streulicht von einem Photodetektor gemessen wird. Die Fluoreszenz ist proportional zur

---

Menge der gebundenen Antikörper. Der Photodetektor wandelt optische Signale in elektrische Impulse um, in dem die Zellen nach der Passage des Laserstrahls in Flüssigkeitstropfen verpackt werden, die je nach Fluoreszenzsignal entweder mit einer positiven oder negativen Ladung versehen sind oder neutral bleiben, wenn keine Antikörper gebunden sind. Die geladenen Flüssigkeitstropfen werden in einem elektrischen Feld abgelenkt und in verschiedene Auffanggefäße geleitet, sodass eine Isolierung bzw. Sortierung der gewünschten Zellpopulation möglich ist.

Die in dieser Arbeit dargestellten FACS-Analysen wurden durch speziell ausgebildete Mitarbeiter des Labors der Frauenklinik München Großhadern mit einem Beckman Coulter Epics XL-MCL Durchflusszytometer (Beckman Coulter, München) durchgeführt.

#### **2.2.7.2 Annexin- Assay**

Untersuchungen zur Apoptose wurden mit Hilfe einer Annexin- Färbung durchgeführt. MCF-7-Zellen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Primaquin für 48 h bei Zellkulturbedingungen inkubiert, anschließend zentrifugiert und die Zellsuspension mit den Farbstoffen Annexin V-FITC und Propidiumiodid versehen. Annexin V ist ein Protein, das spezifisch und mit hoher Affinität in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Phosphatidylserin bindet. In lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin nur an der zytosolischen Innenseite der Zellmembran. Während der frühen Stadien der Apoptose findet jedoch eine Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran statt und wird so für Annexin V zugänglich. Da Annexin V auch in nekrotischen Zellen auf Grund der Membrandurchlässigkeit an Phosphatidylserin auf der zytosolischen Seite der Zellmembran binden kann, wurde zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen gleichzeitig eine Propidiumiodidfärbung durchgeführt. Propidiumiodid ist für Zellen mit intakter Zellmembran impermeabel und bindet nur an die DNA nekrotischer Zellen, wohingegen apoptotische Zellen nur Annexin V-positiv gefärbt sind. FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markiertes Annexin V wurde im FL1- Fluoreszenzkanal bei 575 nm (grüne Fluoreszenz), Propidiumiodid im FL3-Fluoreszenzkanal bei 530 nm (rote Fluoreszenz) mit einem Becton Dickinson FACS-Gerät durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **2.2.7.3 FACS-Analyse zur Induktion von Superoxidradikalen und Gesamt-ROS**

Zum quantitativen Nachweis der Superoxidradikalbildung in MCF-7-Zellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Zellen der Linie MCF-7 wurden für 48 h entweder mit Primaquin, in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ , oder Chloroquin, ebenfalls als Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ , inkubiert. Eine unbehandelte Gruppe diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen für 45 Minuten mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen (Superoxid detection reagent bzw. total ROS detection reagent) als Konzentration von 1:1000 inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen trypsinisiert und in

einem Fluoreszenz-Durchflusszytometer bei einer Wellenlänge von 525 nm (superoxide detection reagent) bzw. 575 nm (total ROS detection reagent) quantifiziert.

## **2.2.8 Western- Blot- Analyse**

### **2.2.8.1 Herstellung der Zelllysate**

Für die Durchführung der Western Blot- Analysen wurden zunächst Proteinlysate der Zelllinien MCF-7, MDA-MB-453 und T-47D hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Zellen in der Kulturflasche trypsinisiert und die Zellsuspension anschließend gleichmäßig auf Petrischalen (10 cm Durchmesser) verteilt. Die Zellen wurden in 10 ml Nährmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Sobald im Lichtmikroskop eine Zellkonfluenz von 70 % erreicht war, konnten die Zellen für die weiteren Experimente verwendet werden. Dazu wurden sowohl MCF-7 als auch MDA-MB-453 Zellen mit Primaquin (in Konzentrationen von 5 µM, 10 µM, 20 µM), sowie mit Geldanamycin und Radicicol (in Konzentrationen von je 1 µg/µl) für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Für weitere Experimente wurden die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-453 sowie T-47D entweder nur mit Primaquin oder Chloroquin (je in einer Konzentration von 50 µM) ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium mit Hilfe einer 5 ml Pipette vorsichtig entfernt und die adhärenen Zellen am Boden der Petrischale mit 250 µl RIPA-Puffer benetzt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde der RIPA- Puffer gleichmäßig verteilt und die Petrischalen anschließend für 30 Minuten bei -20 °C tiefgefroren. Durch die mechanisch wirkenden Kräfte in Folge der Eiskristallbildung wird der Effekt des RIPA-Puffers verstärkt, durch den die Zell- Zellverbände aufgebrochen werden. Anschließend wurden die lysierten Zellen nach kurzem Auftauen aus den Petrischalen in Eppendorf- Cups überführt und bei 19000 rpm für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, wodurch sich das Zellpellet, welches Zellkerne enthält vom proteinenthaltenden Überstand abtrennen ließ. Der proteinenthaltende Überstand wurde in Eppendorf- Cups mit 50 µl 4 x konzentriertem Auftragspuffer vereinigt. Die Proteinlysate wurden bis zur Durchführung der Western Blot-Analysen bei -20 °C gelagert.

### **2.2.8.2 Durchführung der Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine einer Proteinmischung anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Durch das Mitlaufen eines farbigen Markers mit bekannten Proteingrößen konnte die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden.

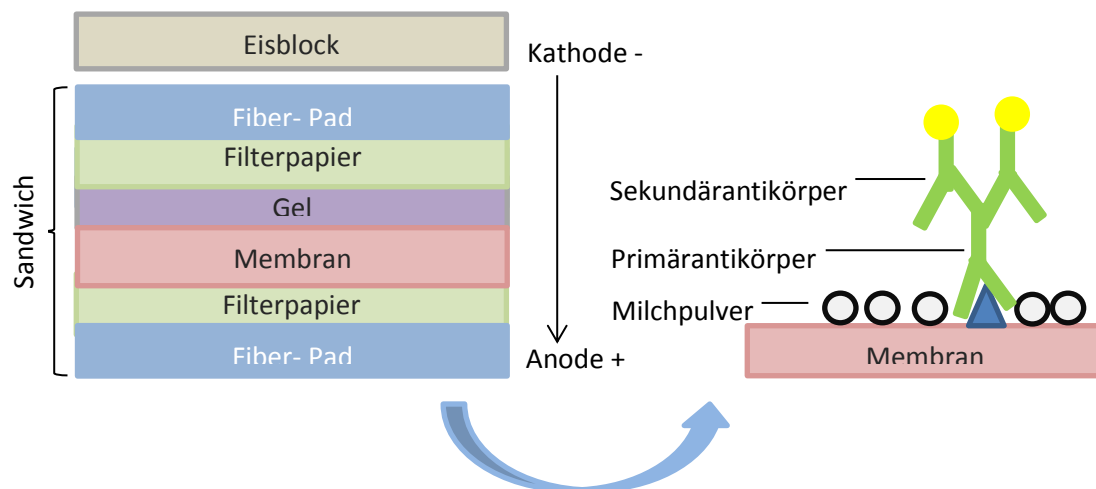
Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden zwei Polyacrylamid- Gelkassetten mit jeweils 12 Probentaschen in die Kassettenhalterung eingesetzt. Diese wurde mit Elektrophoresepuffer (10x Tris/Glycin/SDS Puffer als Konzentration von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) bis an den oberen Rand aufgefüllt. Luftblasen in den Taschen der Gelkassetten wurden durch das Einspritzen von Flüssigkeit durch eine mit Puffer aufgezugene Spritze entfernt. Im Anschluss wurden jeweils 18 µl der aufgetauten Proteinmischung in eine Geltasche pipettiert. Zur optischen Beurteilung des Molekulargewichts und Überwachung des Elektrophoreselaufs wurden 5µl eines farbigen Proteinmarkers in eine zusätzliche Geltasche pipettiert. Die Kassetten wurden an eine Stromquelle mit 90 mA angeschlossen und die Proteine nach ihren Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld aufgetrennt. Sobald der Proteinmarker die Referenzlinie der Gelkassette erreicht hat und somit die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt waren, wurde die Elektrophorese beendet. Dies erfolgte nach etwa 30- 40 Minuten.

### **2.2.8.3 Western- Blot- Methode**

Die mit Protein beladenen Gele wurden mit Hilfe eines Metallclips vorsichtig aus den Kassetten herausgetrennt und je auf eine PVDF- Membran in gekühltem Transferpuffer gelegt (10x Tris/Glycin in einer Konzentration von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt). Die Membran wurde zuvor auf die entsprechende Größe zugeschnitten und für 30 Sekunden in 80% Ethanol getränkt. Die Gele wurden als Sandwich- Technik (Fiber- Pad, Filterpapier, PVDF- Membran, Gel, Filterpapier, Fiber- Pad) in die Blotkassette eingespannt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass zwischen Gelen und PVDF- Membranen keine Luftblasen entstehen. Die Blotkassetten wurden zusammen mit Transferpuffer und einem Eisblock in eine Elektrobplot- Apparatur eingesetzt und bei 200 mA für eine Stunde geblottet. Für einen erfolgreichen Transfer der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran mussten die Gele unbedingt in Richtung Katode und die Membranen in Richtung Anode ausgerichtet sein. Nach dem Blotten wurden die Membranen für mindestens 2 Stunden in Blockingpuffer (4 % Milchpulver in PBS mit 0,05 % Azid und 0,01 % Tween) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geblockt. Anschließend wurde der Erstantikörper in einer Konzentration von 1:1000 in Blockingpuffer verdünnt zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt, die Membran 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper, als Konzentration von 1:1000 in Blockingpuffer verdünnt, für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

#### -Materialien und Methoden-

Nach Entfernung des Zweitantikörpers wurde erneut 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Proteinbanden durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Für die Darstellung der Proteinbanden wurden 10 ml Entwicklungspuffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) mit 66  $\mu\text{l}$  NBT und 33  $\mu\text{l}$  BCIP zu den Membranen hinzugegeben. Unter lichtgeschützten Bedingungen und durch regelmäßiges Schwenken wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Sobald die Farbreaktion ausreichend war, wurden die Membranen mit Leitungswasser gewaschen, getrocknet und eingescannt.



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau des Western Blots.

## **2.2.9 PCR- Analyse**

### **2.2.9.1 RNA- Isolierung**

Für die PCR- Analysen (Polymerase Chain Reaction) wurden MCF-7 Zellen in 6- Well-Platten angesetzt und für 8 h mit Primaquin (in einer Konzentrationen 20  $\mu\text{M}$ ) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  Trizol pro Well lysiert. Direkt im Anschluss wurde die RNA mit Hilfe des Extraktionskits (Direct-zol™ RNA MiniPrep) isoliert. Die gewonnene RNA wurde dann sofort in cDNA umgeschrieben.

### **2.2.9.2 Reverse Transkription**

Bei der Methode der Reversen Transkription wird eine zum RNA- Strang komplementäre DNA (cDNA, copy DNA) synthetisiert. Für einen Reaktionsansatz werden benötigt:

| Menge              | Bestandteil                  |
|--------------------|------------------------------|
| 16,5 $\mu\text{l}$ | RNA                          |
| 0,75 $\mu\text{l}$ | Primer (Oligo dT)            |
| 5 $\mu\text{l}$    | Reverse-Transkriptase-Puffer |
| 1,25 $\mu\text{l}$ | Nukleotide (dNTP Mix)        |
| 1 $\mu\text{l}$    | Reverse Transkriptase        |
| 0,5 $\mu\text{l}$  | RNAse-Inhibitor              |

In einem ersten Schritt wurde die RNA zusammen mit den Primern für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur binden die Oligo dT Primer an den Poly-A-Schwanz der mRNA, die nun im weiteren Verlauf die Startstelle für das Enzym Reverse Transkriptase bilden. Die Proben wurden anschließend sofort auf ein Eisbad gestellt und nach Zugabe der übrigen Reagenzien für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Ausgehend von dem Oligo dT Primer reiht die hitzestabile Reverse Transkriptase Desoxyribonukleotide komplementär zum RNA-Strang aneinander. Die umgeschriebene cDNA wurde bis zur Durchführung der PCR-Versuche bei -20°C gelagert.

### **2.2.9.3 Polymerasekettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird eine bestimmte DNA-Sequenz, unter Nutzung des in vivo Replikationsmechanismus, beliebig oft in vitro vervielfacht (amplifiziert). Die zu vervielfältigende DNA-Sequenz, das Amplikon, wird von zwei sequenzspezifischen Primern (Oligonukleotide), einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer flankiert, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz zwischen sich einschließen. In jedem PCR-Zyklus wird das Amplikon verdoppelt, sodass nach durchlaufen

von 20-40 Zyklen eine exponentielle Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz stattgefunden hat. Mit dieser Methode können bereits kleinste Mengen mRNA in einer Zelle nachgewiesen werden. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt. Für die vorliegenden Versuche wurde eine Anzahl von 29 Zyklen gewählt. Jeder Zyklus besteht aus drei Abschnitten:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstrangs (bei einer Temperatur von 94 °C),
2. Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge „Annealing“ (bei einer Temperatur von 50-60 °C),
3. Elongation (bei einer Temperatur von 72 °C).

Die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase ermöglichte die automatisierte Abfolge der einzelnen Zyklen, ohne dass das Enzym dabei zerstört wurde. Die PCR-Produkte wurden anschließend bis zur Auftragung auf das Agarosegel bei 4 °C gelagert.

Zusammensetzung für einen 25 µl PCR-Reaktionsansatz:

| Menge   | Bestandteil  |
|---------|--|
| 12,5 µl | PCR-Master Mix   |
| 10,5 µl | destilliertes Wasser   |
| 1 µl    | cDNA   |
| 1 µl    | Primer-Mix (bestehend aus 5 µl Vorwärts- und 5 µl Rückwärtsprimer<br>90 µl destilliertem Wasser) |

Die verwendeten Primer wurden über die Firma „biomers.net“ bestellt und sind in Tab. 3 aufgelistet.

#### **2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese**

Für die Auswertung wurden die PCR-Produkte zur Sichtbarmachung mit Ladepuffer (6x Mass Buffer) auf ein Agarosegel (E-Gel® 2% with SYBR Safe™) aufgetragen und an eine Stromquelle angeschlossen. Dafür wurden jeweils 16 µl des PCR-Produkts mit einem Tropfen Ladepuffer vermischt und in eine Tasche des Agarosegels hinein pipettiert. Auf Grund der Wanderung im elektrischen Feld wurden die DNA-Fragmente im Gel nach Größe und Ladung aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der PCR-Produkte war das Agarosegel mit einem an die DNA bindenden SYBR-Farbstoff versehen, der durch Anregung mit UV-Licht in einem Transilluminator fluoreszierte. Die sichtbaren DNA-Banden wurden nach jedem Elektrophoreselauf fotografiert.



### 3 Ergebnisse

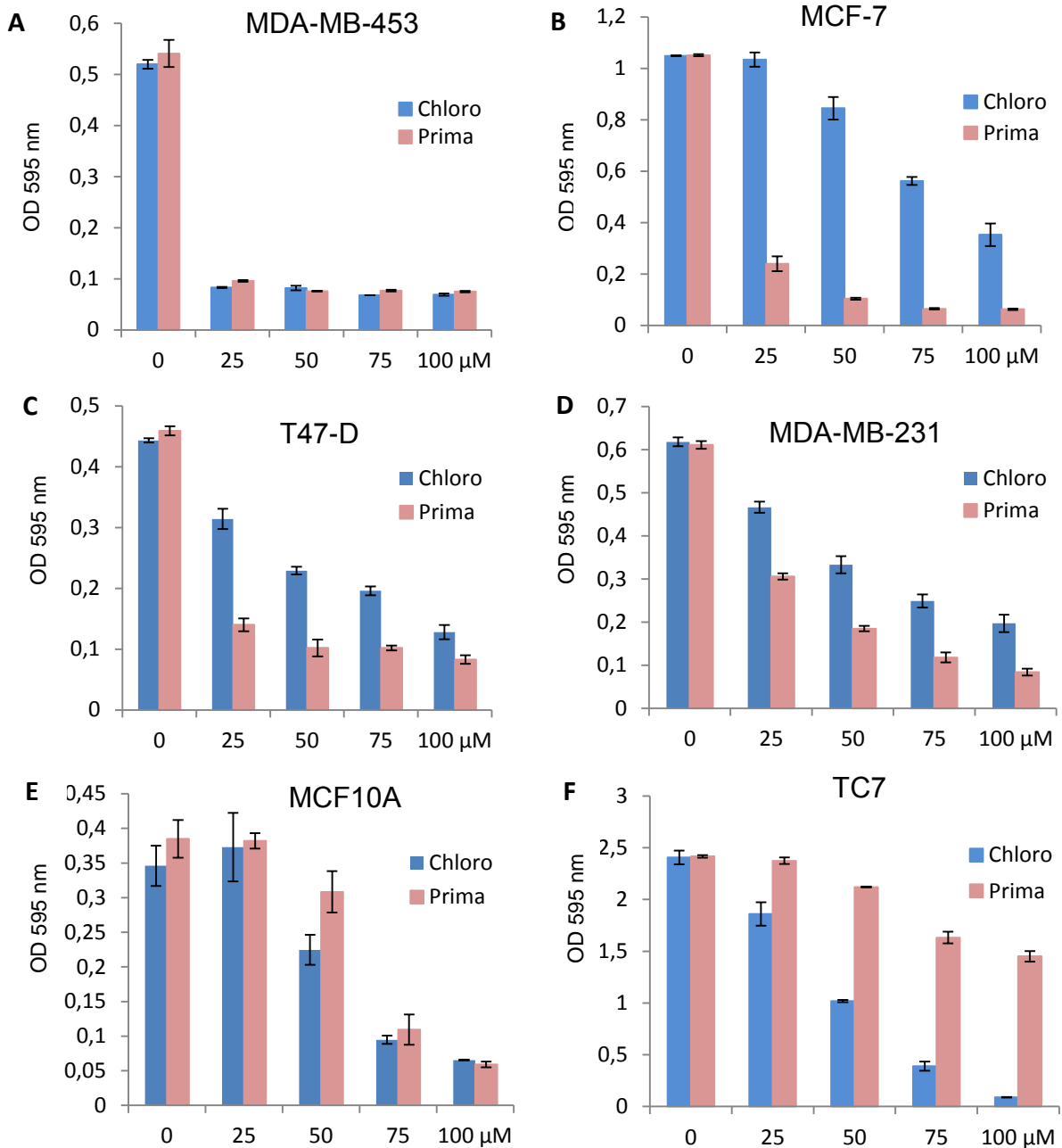
#### 3.1 Einfluss von Primaquin und Chloroquin auf das Tumorzellwachstum

Um den Einfluss von Primaquin auf das Zellüberleben verschiedener humaner Zelllinien zu untersuchen, wurde ein MTT-Zellvitalitätstest durchgeführt (Abb.6). Die epithelialen Brustkrebszelllinien MDA-MB-453, MCF-7, T47-D und MDA-MB-231 wurden mit steigenden Primaquin Konzentrationen (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe für 72 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Dieselben Zelllinien wurden zum Vergleich ebenfalls mit steigenden Chloroquin Konzentrationen (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) inkubiert.

Bis auf die Zelllinie MDA-MB-453, bei der die Zellüberlebensrate sowohl durch Primaquin als auch durch Chloroquin ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M annähernd identisch abnahm, konnte bei den anderen Brustkrebszelllinien eine stärkere Reduktion der Zellvitalität durch Primaquin (rote Balken) im Vergleich zu Chloroquin (blaue Balken) bereits ab Konzentrationen von 25  $\mu$ M beobachtet werden.

Neben der Wirkung auf Tumorzellen wurde im MTT-Assay der Effekt von Primaquin und Chloroquin auch auf immortalisierte benigne Mammaepithelzellen (MCF10A) sowie auf immortalisierte Enterozyten (TC7) untersucht. Auffallend war, dass beide Substanzen das Zellüberleben der benignen Zelllinie MCF10A erst ab sehr hohen Konzentrationen von 75  $\mu$ M deutlich reduzierten. Die Ergebnisse in Abb.6 F zeigen, dass Enterozyten (TC7) deutlich sensibler auf Chloroquin reagieren und Primaquin dagegen selbst in hohen Konzentrationen von 100  $\mu$ M nur einen geringen zytotoxischen Effekt auf Enterozyten hat.

-Ergebnisse-



**Abbildung 6: Einfluss von Primaquin und Chloroquin auf das Zellüberleben.** Die humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-453, MCF-7, T47-D, MDA-MB-231, die benigne epitheliale Mammazelllinie MCF10A sowie Enterozyten der Zelllinie TC7 wurden mit steigenden Primaquin oder Chloroquin Konzentrationen (25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM) für 72 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Reader bei 595 nm.

### 3.2 Untersuchungen zur HSP90 Inhibierung durch Primaquin

Das Hitzeschockprotein 90 stellt als molekulares Chaperon eine wichtige Funktion für das Zellüberleben dar. Durch die Bindung und Stabilisierung so genannter „client Proteine“ werden diese vor ihrem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom- System geschützt. Viele dieser „client Proteine“ sind Onkoproteine, wie z.B. Kinasen (bcr-abl, HER-2), Transkriptionsfaktoren (HSF-1, HIF-1), Steroidhormonrezeptoren (Östrogen-, Androgen- und Glukokortikoidrezeptoren) oder Antiapoptosefaktoren (bcl-2), die das Zellwachstum- und Proliferation fördern und das Zellüberleben schützen.

HSP90 ist als Angriffspunkt in der Krebstherapie insofern interessant, da durch eine Inhibition dieses Proteins gleichzeitig mehrere onkogene Signalwege in einer Tumorzelle ausgeschaltet werden (Jego et al. 2013). Hinweise aus der Literatur, das Malariamedikament Primaquin könnte ebenfalls eine HSP90 inhibierende Wirkung haben, ergaben den Anlass diese Hypothese weiter zu verfolgen.

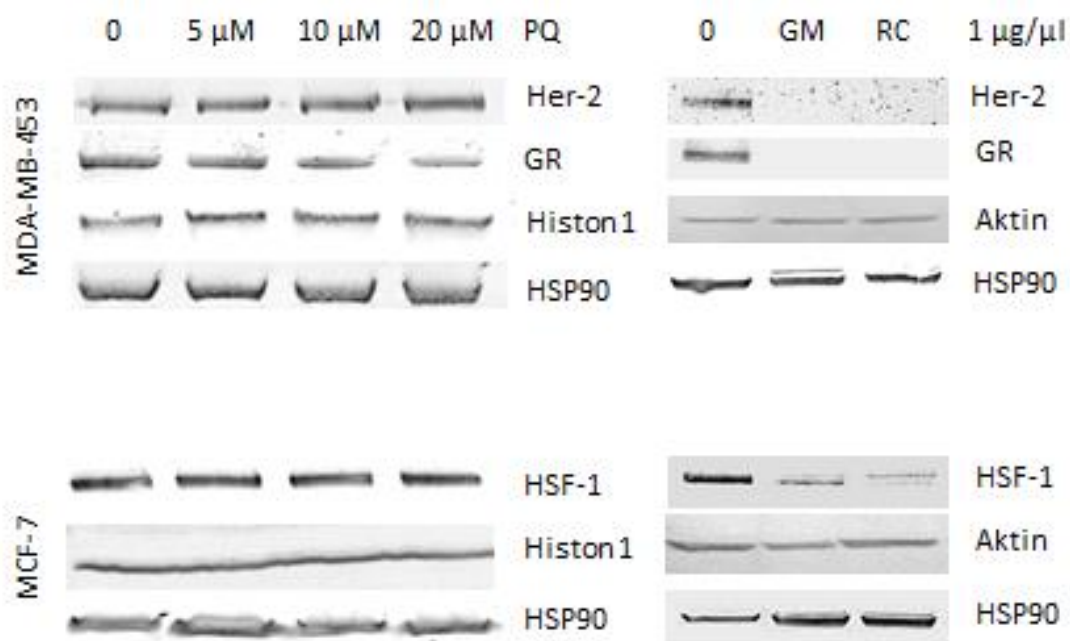
In Western- Blot Analysen wurden auf molekularer Ebene ausgewählte „client Proteine“ bezüglich ihrer Expression in Brustkrebszellen unter Primaquin Einfluss untersucht. Zellen der Linie MCF-7 und MDA-MB-453 wurden für 24 h mit steigenden Primaquinkonzentrationen (5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM) inkubiert. Die Gruppe, die keine Medikamente erhielt diente als Negativkontrolle und erhielt die gleiche Konzentration an Lösungsmittel (destilliertes Wasser).

Das an den 453-Zellen untersuchte Protein humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER-2) wies selbst bei hohen Primaquinkonzentrationen von 20 µM keine verminderte Expression auf, wohin gegen beim untersuchten Glukokortikoidrezeptor (GR) in diesem Experiment eine geringe Abnahme der Proteinexpression zu beobachten war, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt war verglichen mit der Wirkung der natürlichen HSP90- Inhibitoren. Auch die Expression des an MCF-7-Zellen untersuchten Proteins, der Transkriptionsfaktor „Heat shock factor-1“ (HSF-1), blieb unter Primaquin Einfluss unverändert. In diesem Experiment wurde das Histon-Protein 1 als Haushaltsgen verwendet. Es ist ein hochkonserviertes Protein, das der Aufspiralisierung der DNA im Zellkern dient und somit bei allen eukaryotischen Zellen immer gleich stark exprimiert und in der Regel nicht reguliert wird. Die Expression von HSP90 selbst wird weder bei der Zelllinie MCF-7, noch bei der Linie MDA-MB-453 durch Primaquin beeinflusst.

Als Positivkontrolle wurde in einem zweiten Experiment die Expression der gleichen „client Proteine“ an Brustkrebszellen untersucht, die für 24 h mit bekannten natürlichen HSP90- Inhibitoren, Geldanamycin bzw. Radicicol als Konzentration von 1 µg/ml, inkubiert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Konzentration an Lösungsmittel (1:1000 DMSO). In diesem Experiment wurde Aktin, das als Bestandteil des Zytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist, als Haushaltsgen verwendet. Sowohl bei MCF-7 als auch bei 453-Zellen

## -Ergebnisse-

erkennt man eine deutliche Abnahme der Proteinexpression der „client Proteine“ (HER-2 und GR bzw. HSF-1) nach Inkubation mit Geldanamycin bzw. Radicolol, da diese nun nicht mehr stabilisiert werden und über das Ubiquitin- Proteasom-System vermehrt abgebaut werden. HSP90-Inhibitoren wie Geldanamycin und Radicolol hemmen nicht die Proteinexpression, sondern nur die HSP90-Aktivität, indem sie als Nukleotid- Mimetika an die N-terminale ATP-Domäne des Chaperons binden, wodurch die ATP-ase- Aktivität inhibiert und somit der Aktivitätszyklus für die Proteinfaltung-und Stabilisierung unterbrochen wird (Jego et al. 2013). In den Western-Blot Analysen ist daher keine Abnahme der HSP90-Expression unter Einfluss von Geldanamycin oder Radicolol zu sehen. MCF-7-Zellen weisen sogar eine leichte Hochregulation von HSP90, verglichen mit der Kontrolle, auf.



**Abbildung 7: Western-Blot Analyse der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 für ausgewählte HSP90 „client Proteine“.** Brustkrebszellen der Linie MCF-7 und MDA-MB-453 wurden für 24 h mit steigenden Primaquinoximkonzentrationen inkubiert und auf ihre Expression von HSP90 „client Proteinen“ untersucht. Vergleichend wurden die selben Proteine unter dem Einfluss von bekannten HSP90 Inhibitoren, Geldanamycin und Radicolol, untersucht. Primaquinoxim zeigte keine Inhibition der HSP90-Aktivität. PQ = Primaquinoxim, GM = Geldanamycin, RC = Radicolol.

### **3.3 Untersuchungen zum Zelltod durch Primaquin an MCF-7-Zellen**

#### **3.3.1 Der Einfluss von Primaquin auf die Morphologie und Autophagie von Tumorzellen**

Der Prozess der Autophagie ist der Hauptmechanismus über den zytoplasmatische Zellbestandteile, wie geschädigte Proteine, Proteinaggregate, oder gealterte Zellorganellen mit Hilfe lysosomaler Enzyme abgebaut werden. Die dabei freigesetzten Aminosäuren, Fettsäuren und Zuckermoleküle werden entweder zur Neusynthese von Biomolekülen oder als Energiequelle in Zeiten von Nährstoffmangel verwendet. Die Rolle von Autophagie in Krebszellen ist umstritten, da einerseits tumorsupprimierende als auch wachstumsfördernde Effekte beschrieben werden. Autophagie stellt für Krebszellen einen Schutzmechanismus dar, der es ermöglicht auch unter erschwerten Bedingungen, wie z.B. Gewebhypoxie, saurem pH-Wert und Mangel an Blutgefäßen genügend Energie für das Zellüberleben- und Wachstum bereitzustellen. Andererseits ist wiederum beschrieben worden, dass exzessive Autophagie auch den Zelltod in Tumorzellen auslösen kann.

Das Malariamedikament Chloroquin ist ein bekannter Autophagie-Inhibitor, der den Abbau von Autolysosomen und darin enthaltener Zellbestandteile hemmt. Durch den daraus resultierenden Energiemangel und zytotoxischen Effekt geschädigter Proteine und Zellorganellen können Krebszellen durch eine Kombination mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin gegenüber Chemotherapeutika sensibilisiert und die Wirkung der Krebstherapie verstärkt werden.

Da sowohl Primaquin als auch Chloroquin Malariamedikamente der Quinolingruppe mit chemisch ähnlicher Struktur sind, wurde auch der Einfluss von Primaquin auf den Prozess der Autophagie untersucht.

Für Fluoreszenzuntersuchungen wurden MCF-7-Zellen in drei Gruppen unterteilt. Neben der Kontrolle wurde eine Gruppe mit 50  $\mu$ M Primaquin, die andere mit 50  $\mu$ M Chloroquin für jeweils 24 h und 48 h inkubiert und anschließend mit dem Autophagiemarker Monodansylcadaverin (MDC) (in einer Konzentration von 1:1000 mit Medium verdünnt) für 20 Minuten bei 37 °C gefärbt. MDC ist ein Zellfarbstoff der sich spezifisch in Autophagie-Vakuolen anreichert und kann daher als in vivo Marker zum Nachweis von Autophagie verwendet werden (Biederbick et al. 1995).

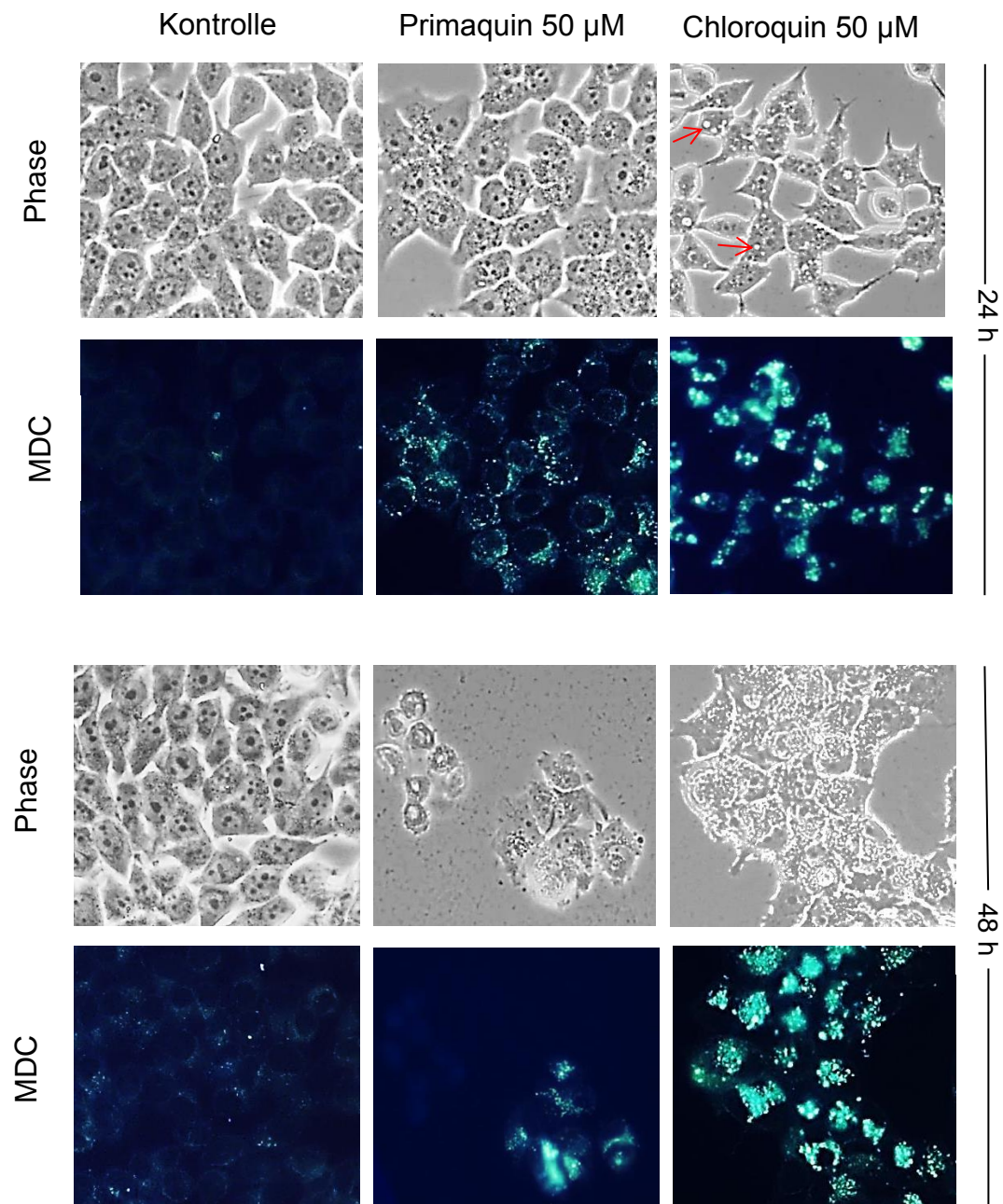
In den mit Chloroquin behandelten Zellen konnte bereits nach 24 h eine Vakuolisierung der Zellen (rote Pfeile) und eine starke Anreicherung des Autophagiemarkers beobachtet werden, als Folge des gestörten Autophagieprozesses und Akkumulation der Autolysosomen. Hingegen konnte in den mit Primaquin inkubierten MCF-7-Zellen nach 24 h nur eine geringe Anreicherung des Farbstoffs beobachtet werden. Auch in der Kontrolle ist eine minimale Aufnahme des Autophagiemarkers zu erkennen, da Autophagie ein physiologischer und

lebensnotwendiger Mechanismus ist, der in geringem Ausmaß in allen eukaryotischen Zellen zum Aufrechterhalt der Homöostase stattfindet.

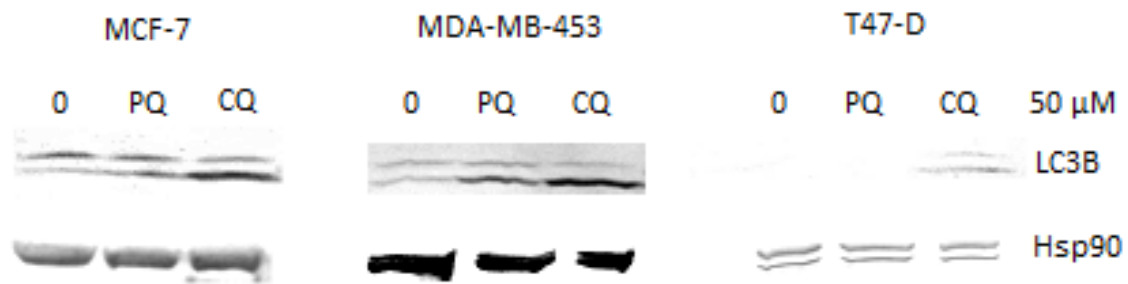
Überraschenderweise wiesen die Chloroquin behandelten Zellen nach 24 h im Lichtmikroskop eine viel stärkere zellmorphologische Schädigung auf als die Gruppe, die für die gleiche Zeit mit Primaquin inkubiert wurde und bei der fast keine Veränderung nachweisbar war. Nach einer längeren Inkubationszeit von 48 h konnte jedoch in der mit Primaquin behandelten Gruppe eine zunehmende und, im Vergleich zu Chloroquin, stärkere zellmorphologische Schädigung beobachtet werden. Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen stimmen demnach mit den Ergebnissen des MTT- Assays aus Abb. 6 (Inkubationszeit für 72 h) überein und deuten darauf hin, dass der zytotoxische Effekt von Primaquin ein langfristiger Effekt ist.

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde der Zusammenhang von Primaquin und Autophagie auch auf molekularer Ebene mit Hilfe von Western-Blot Analysen untersucht. Brustkrebszellen der Linie MCF-7, MDA-MB-453 und T47-D wurden für 24 h entweder mit Primaquin oder Chloroquin in Konzentrationen von je 50  $\mu$ M inkubiert. An den Proteinlysaten wurde die Expression der Proteine LC3b (LC3b I und LC3b II) und HSP90 (HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$ ) untersucht. LC3b (microtubule associated protein light chain 3) ist ein Protein, das als Autophagiemarker verwendet werden kann (Mizushima and Yoshimori 2007). LC3b II (untere Bande) ist die lipidmodifizierte Form des Proteins, die an die Membran der Autophagosomen gebunden ist und normalerweise zusammen mit dem Inhalt der Autolysosomen abgebaut wird. Die Menge des LC3b II Proteins korreliert mit der Anzahl der Autophagosomen und steigt an, wenn Autophagie gehemmt wird. Abb. 9 zeigt eine Zunahme des LC3b II Proteins in allen untersuchten Zelllinien, die mit 50  $\mu$ M Chloroquin inkubiert wurden, da es durch den Autophagie-inhibierenden Einfluss von Chloroquin nicht mehr abgebaut wird und akkumuliert. Auch in Primaquin behandelten MCF-7 und MDA-MB-453 Zellen konnte ein leichter Anstieg des LC3b II Proteins beobachtet werden, der allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war verglichen mit Chloroquin. HSP90 wurde in diesem Experiment als Auftragungskontrolle verwendet.

Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen der Abbildungen 8 und 9 hervor, dass sich die antitumorale Wirkung der Malariamedikamente Primaquin und Chloroquin, trotz ihrer chemisch ähnlichen Aminoquinolinstruktur, unterscheidet und der antitumorale Effekt von Primaquin nicht auf einer Inhibition von Autophagie beruht.



**Abbildung 8: Vergleich des Effekts von Primaquin und Chloroquin auf Autophagie an MCF-7-Zellen.** MCF-7 Zellen wurden entweder mit Primaquin (50  $\mu$ M) oder Chloroquin (50  $\mu$ M) für 24 h und 48 h inkubiert und anschließend mit dem Autophagiemarker Monodansylcadaverin gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung.



**Abbildung 9: Vergleich des Effekts von Primaquin und Chloroquin auf Autophagie.** Die Western-Blot Analyse untersuchte die Expression des Autophagiemarkers LC3b an den Brustkrebszelllinien MCF-7, MDA-MB-453 und T47-D, die entweder mit Primaquin oder Chloroquin in Konzentrationen von je 50 µM für 24 h inkubiert wurden. Das molekulare Chaperon HSP90 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein und wurde als Auftragungskontrolle verwendet.

### 3.3.2 Primaquin hemmt die Expression von Ki67 in MCF-7-Tumorzellen

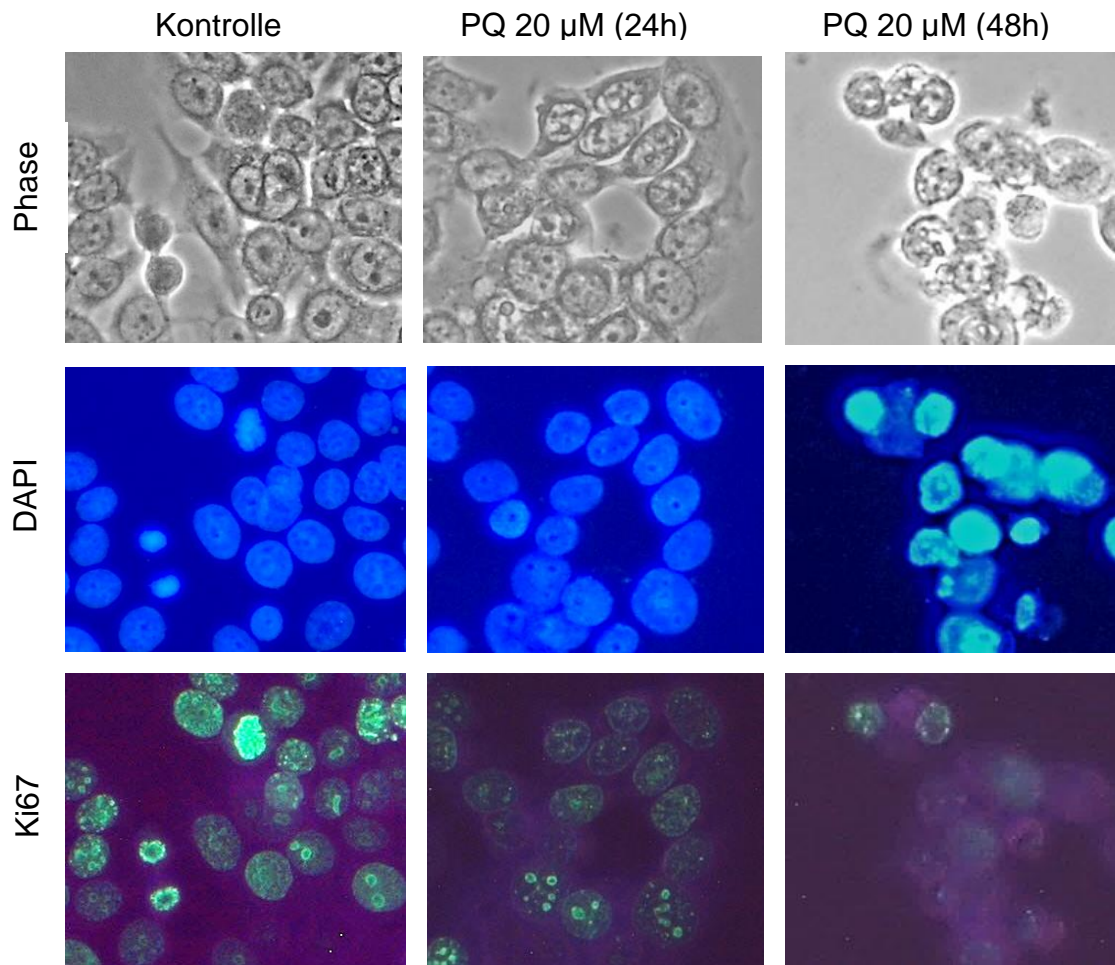
Das Ki67 Antigen ist ein nukleäres Protein und wird als Marker der Zellproliferation eingesetzt. Eine Ki67 Expression ist nur während der aktiven Phasen des Zellzyklus ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) nachweisbar, nicht jedoch bei ruhenden Zellen, die sich in der  $G_0$ -Phase befinden. Ki67 kann daher zur Beurteilung der Wachstumsfraktion einer Tumorzellpopulation eingesetzt werden (Scholzen and Gerdes 2000).

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 24 h und 48 h mit 20 µM Primaquin inkubiert und anschließend immunhistochemisch auf die Expression von Ki67 untersucht. Unbehandelte MCF-7-Zellen dienten als Negativkontrolle. Gleichzeitig erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol), einem DNA-bindenden Farbstoff, der bei Anregung mit UV-Licht blau fluoresziert.

Primaquin behandelte MCF-7 Zellen wiesen in der Immunfluoreszenzanalyse eine zeitabhängige Abnahme der Ki67- Expression nach 48 h auf (grüne Fluoreszenz), sowie eine vermehrte Chromatinkondensation, was bedeutet, dass Primaquin die Proliferation von MCF-7 Tumorzellen hemmt. Jedoch wurde keine Zellkernfragmentierung beobachtet, wie sie bei einem klassischen apoptotischen Zelltod zu finden ist.



-Ergebnisse-



**Abbildung 10: Hemmung der Ki67-Expression durch Primaquin in MCF-7-Zellen.** MCF-7-Zellen wurden auf Deckgläsern angesetzt und mit 20  $\mu$ M Primaquin für 24 h und 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 100% Ethanol fixiert, mit dem Ki67 Antikörper, sowie einem Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und in Vectashield Einbettmedium eingebettet. Primaquin zeigt eine zeitabhängige Hemmung der Zellproliferation von MCF-7-Tumorzellen durch Abnahme der Ki67 Expression. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskop mit einem Filter von 525 nm Wellenlänge bei 40-facher Vergrößerung.

### 3.3.3 Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch Primaquin in Brustkrebszellen

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ist ein wichtiges Kennzeichen des programmierten Zelltods (Apoptose). Dabei muss das innere mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) vom äußeren unterschieden werden. Während Veränderungen der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran durch Porenbildung mit folgender Freisetzung proapoptotischer Faktoren z.B. Cytochrom C aus dem Intermembranraum, einen wichtigen Schritt in der Einleitung des intrinsischen Apoptosewegs in Zellen darstellt, ist ein Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Membranpotentials nicht zwingend mit Apoptose assoziiert, kann jedoch als Folge einer erhöhten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran auftreten. Die Protonenpumpen der Atmungskette, welche an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, bauen über der ansonsten für Ionen impermeablen inneren Mitochondrienmembran einen elektrochemischen Protonengradienten auf, der die treibende Energie für die ATP-Synthase (Komplex V) liefert. Ein Verlust des inneren mitochondrialen Membranpotentials resultiert daher zunächst in einem Energiemangel, der letztendlich auch zum Zelltod führt. Das mitochondriale Membranpotential ist ein wichtiger Indikator für den Funktionszustand einer Zelle und kann mit Fluoreszenzfarbstoffen mikroskopisch untersucht werden. Zur genaueren Untersuchung des durch Primaquin induzierten Zelltods wurde in diesem Versuch der Einfluss von Primaquin auf das innere mitochondriale Membranpotential mit dem Mitotracker JC-1 analysiert.

MCF-7-Zellen wurden in drei Gruppen unterteilt: Kontrolle, Inkubation mit Primaquin für 24 h und für 48 h jeweils als Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Alle Gruppen wurden anschließend mit dem Mitotracker (in einer Konzentration von 1:1000 mit Medium verdünnt) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. JC-1 (5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) ist ein positiv geladener Carbocyanin Farbstoff, der als Monomer grün fluoresziert. Als lipophiler Farbstoff kann er die Membranen passieren und reichert sich an der negativ geladenen Innenseite der inneren Mitochondrienmembran an, wo sich durch Kristallisation sein Fluoreszenzspektrum zum längerwelligen Licht (rot) verändert.

In der unbehandelten Kontrollgruppe mit energiereichen Mitochondrien und hohem (hyperpolarisiertem) Membranpotential bildeten sich daher ab einer Sättigung der Farbstoffkonzentration kristalline „J-Aggregate“ aus, die als gelb-orange fluoreszierende Punkte die intakten Mitochondrien markieren. Die Gruppe, die für 24 h mit Primaquin inkubiert wurde zeigte bereits eine geringere Farbintensität, sowie vereinzelt einen Farbumschlag zu grüner Fluoreszenz (siehe Pfeile). Nach 48 h Inkubation waren kaum noch intakte Mitochondrien zu erkennen, sondern fast ausschließlich eine diffuse grüne

Fluoreszenz des Mitotrackers, der bei niedrigem (depolarisiertem) Membranpotential keine Aggregate mehr bildet, sondern als Monomer im Zytosol der Zellen vorliegt.

Die deutliche Abnahme der gelb-orangen Farbe in den für 48 h mit Primaquin behandelten Zellen entspricht einem starken Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Membranpotentials, wie es in den frühen Stadien apoptotischer und nekrotischer Zellen zu finden ist. Allerdings wurden lichtmikroskopisch keine morphologischen Kennzeichen eines klassischen apoptotischen Zelltods beobachtet, wie z.B. eine Zellschrumpfung, Zellkernfragmentierung, „membrane blebbing“ oder Apoptosekörperchen.

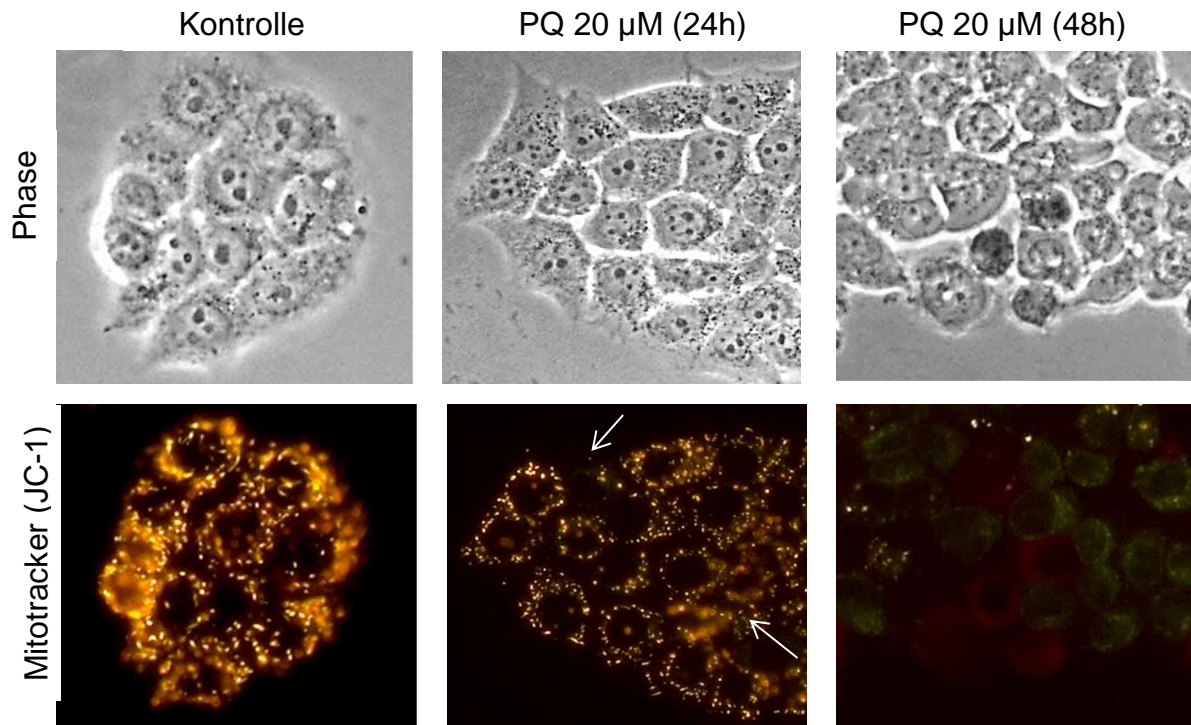
Zur weiteren Untersuchung der Zellviabilität wurden die MCF-7 Zellen nach Entfernung des Mitotrackers für 2 Minuten mit 0,4% Trypanblau bei Raumtemperatur gefärbt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht passieren kann und sich selektiv in toten Zellen anreichert und diese dunkelblau färbt. Trypanblau kann als spezifischer Marker für nekrotische Zellen verwendet werden, da nur bei einem nekrotischen Zelltod die Zellmembran permeabel wird, im Gegensatz zur Apoptose, bei der Apoptosekörperchen weiterhin von einer intakten Membran umgeben sind. Durch Trypanblau gefärbte tote Zellen konnten vereinzelt in den für 48 h inkubierten Zellen im Phasenkontrast (hier dunkelgrau) sowie im Fluoreszenzmikroskop (hier rot) nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung der lichtmikroskopischen Beobachtungen wurde eine Annexin-V-FITC Färbung an MCF-7-Zellen durchgeführt, die für 48 h entweder mit 10  $\mu\text{M}$  oder 20  $\mu\text{M}$  Primaquin inkubiert wurden. Ein frühes Ereignis des programmierten Zelltods ist der Verlust der Membranasymmetrie durch Translokation der phosphatidylserinhaltigen Membranphospholipide von der zytosolischen Innenseite der Zellmembran an die Außenseite, wo sie als Erkennungssignal für Phagozyten fungieren. Fluoreszenzmarkiertes Annexin V ist ein Protein, das in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spezifisch an Phosphatidylserin der Membranphospholipide bindet und wird daher als Marker früher Apoptosestadien eingesetzt (van Engeland et al. 1998). Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde gleichzeitig eine Propidiumiodidfärbung durchgeführt. Propidiumiodid ist ein DNA-bindender Farbstoff, der nur von Zellen mit löchriger Membran aufgenommen wird und somit nur nekrotische Zellen, jedoch keine lebenden und (früh-) apoptotischen Zellen rot anfärbt.

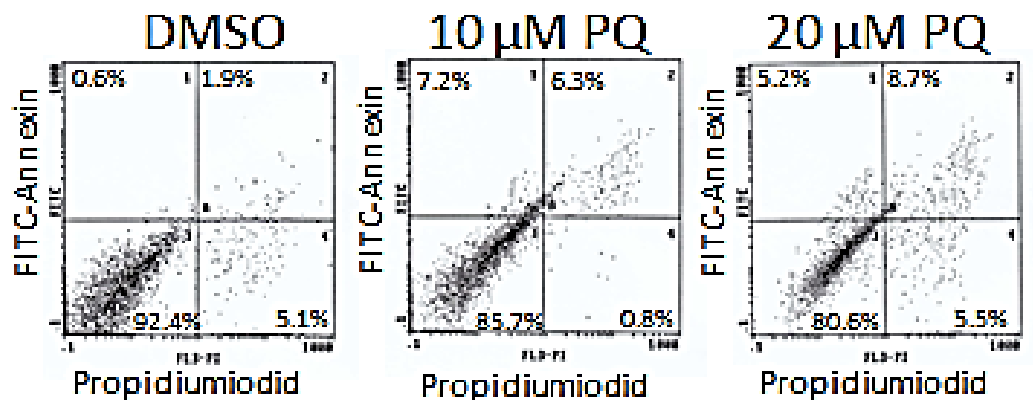
Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz ist in Abb. 12 als Dot-Plot dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl lebender Zellen insgesamt von 92,4 % auf 80,6 % abgenommen hat. In mit 20  $\mu\text{M}$  Primaquin behandelten Zellen hat nur eine geringfügige Verschiebung der Zellpopulation, von 0,6 % auf 5,2 %, in den apoptotischen Bereich stattgefunden. Zusätzlich kam es auch bei der nekrotischen Zellpopulation nur zu einer niedrigen Zunahme von 5,1 % auf 5,5 %, was mit den Ergebnissen der Trypanblaufärbung übereinstimmt, wo eine Farbstoffaufnahme nur in vereinzelt Zellen nachweisbar war.

-Ergebnisse-

Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen der Abbildungen 11 und 12 hervor, dass Primaquin in MCF-7- Zellen einem starken Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Membranpotentials bewirkt, der induzierte Zelltod jedoch weder einem klassischen apoptotischen noch klassischen nekrotischen Weg folgt.



**Abbildung 11: Einfluss von Primaquin auf das mitochondriale Membranpotential.** MCF-7- Zellen wurden entweder für 24 h oder für 48 h mit Primaquin inkubiert und mit dem Mitotracker (JC-1) sowie Trypanblau gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch ein Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Mit Trypanblau gefärbte Zellen weisen eine leicht rötliche Fluoreszenz unter UV-Anregung auf.



**Abbildung 12: Zweidimensionale Dot-Plot Darstellung der Annexin-V-FITC/ PI-Färbung.** MCF-7-Zellen wurden für 48 h entweder mit 10 µM oder 20 µM Primaquin inkubiert und die Fluoreszenz von Annexin-V-FITC (als früher Apoptosemarker) und Propidiumiodid (als Marker für Membrandurchlässigkeit) durchflusszytometrisch bestimmt. Vitale Zellen sind Annexin-V negativ und PI negativ (linker unterer Quadrant). Apoptotische Zellen sind Annexin-V positiv gefärbt und PI negativ (linker oberer Quadrant). Nekrotische Zellen sind PI positiv gefärbt (rechter unterer Quadrant). Mischformen und Übergänge von apoptotisch zu nekrotisch sind möglich (rechter oberer Quadrant). Die Abbildung zeigt insgesamt nur eine leichte Verschiebung der Zellpopulation in den apoptotischen Bereich. Die Zunahme der nekrotischen Zellpopulation von 5,1 % auf 5,5 % ist ebenfalls nur gering ausgeprägt. Unabhängig von der analytisch notwendigen, aber auch willkürlich-eingrenzenden Quadranteneinteilung ist jedoch auch insgesamt eine kontinuierliche Verschiebung der Zellpopulation vom linken unteren Quadranten zum rechten oberen Quadranten zu beobachten.

### 3.3.4 Induktion von oxidativem Stress durch Primaquin in Brustkrebszellen

#### 3.3.4.1 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7- Zellen durch Primaquin

Primaquin kann bei Patienten mit einem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel schwere hämolytische Anämien verursachen. Auf Grund des Enzymmangels kann nicht mehr ausreichend Glutathion als antioxidativer Schutz regeneriert werden, um die bei der Biotransformation durch Cytochrom P450- Enzyme entstehenden reaktiven Metabolite und Superoxidradikale zu neutralisieren, was zu oxidativem Stress und folglich Hämolyse führt.

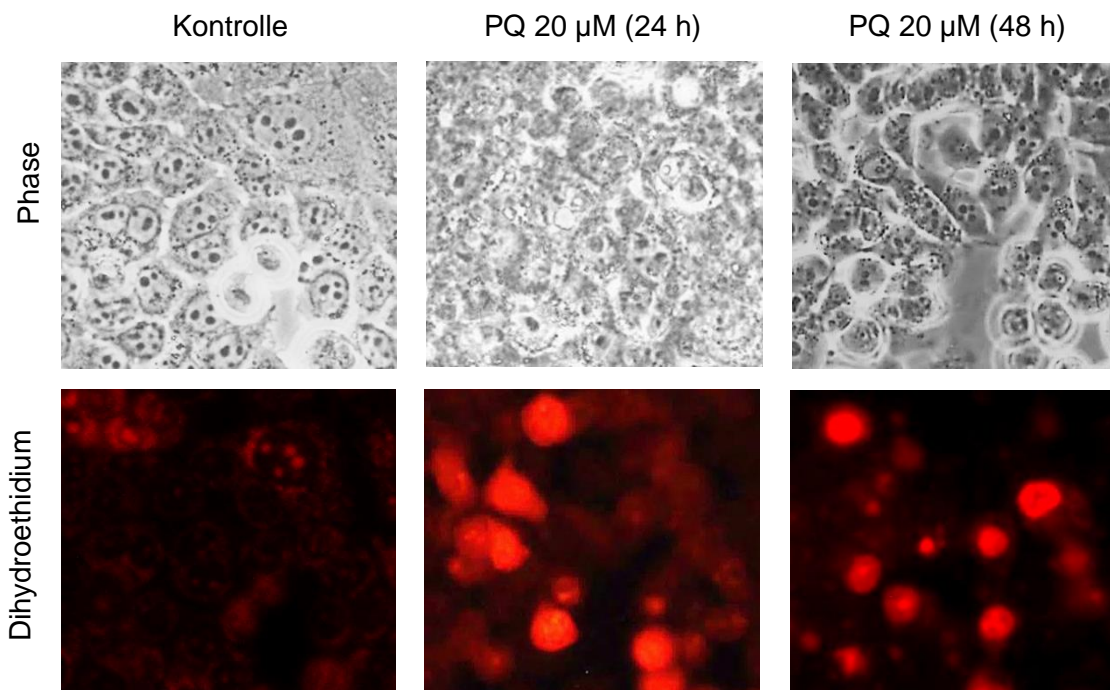
Um den Mechanismus, welcher der antitumoralen Wirkung von Primaquin zu Grunde liegt näher zu erörtern, wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Brustkrebszellen, als Marker für oxidativen Stress, sowohl fluoreszenzmikroskopisch, als auch durchflusszytometrisch untersucht. MCF-7-Zellen wurden entweder für 24 h oder für 48 h mit Primaquin in einer Konzentration von 20 µM inkubiert. Die Gruppe, die keine Medikamente erhielt diente als Negativkontrolle.

Sowohl die behandelten Zellen, als auch die Negativkontrolle wurden anschließend für 2 Stunden bei 37 °C mit Dihydroethidium inkubiert. Dihydroethidium ist ein

### -Ergebnisse-

membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch mit Superoxidradikalen reagiert und dann nach Interkalation in die DNA orange fluoresziert. Im Fluoreszenzmikroskop konnte eine zeitabhängige Bildung von Superoxidradikalen in lebenden MCF-7 -Zellen beobachtet werden (vergleiche Abb.13).

Während in der Kontrolle kaum eine Fluoreszenz zu erkennen war, wurden in Primaquin behandelten Zellen bereits nach 24 h Superoxidradikale durch orangen Farbstoff sichtbar. Nach 48 h kam es zu einer weiteren Zunahme der Fluoreszenz, was darauf hindeutet, dass die Induktion von ROS durch Primaquin in Brustkrebszellen ein zeitabhängiger Prozess ist, der die Aktivierung des Medikaments durch seine Metabolisierung über CytochromP450-Enzyme zu redoxaktiven Metaboliten voraussetzt.



**Abbildung 13: Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7- Zellen durch Primaquin.** MCF-7- Zellen wurden sowohl für 24 h als auch für 48 h mit 20  $\mu$ M Primaquin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe inkubiert und anschließend mit Dihydroethidium gefärbt. Die Auswertung erfolgte im Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung.

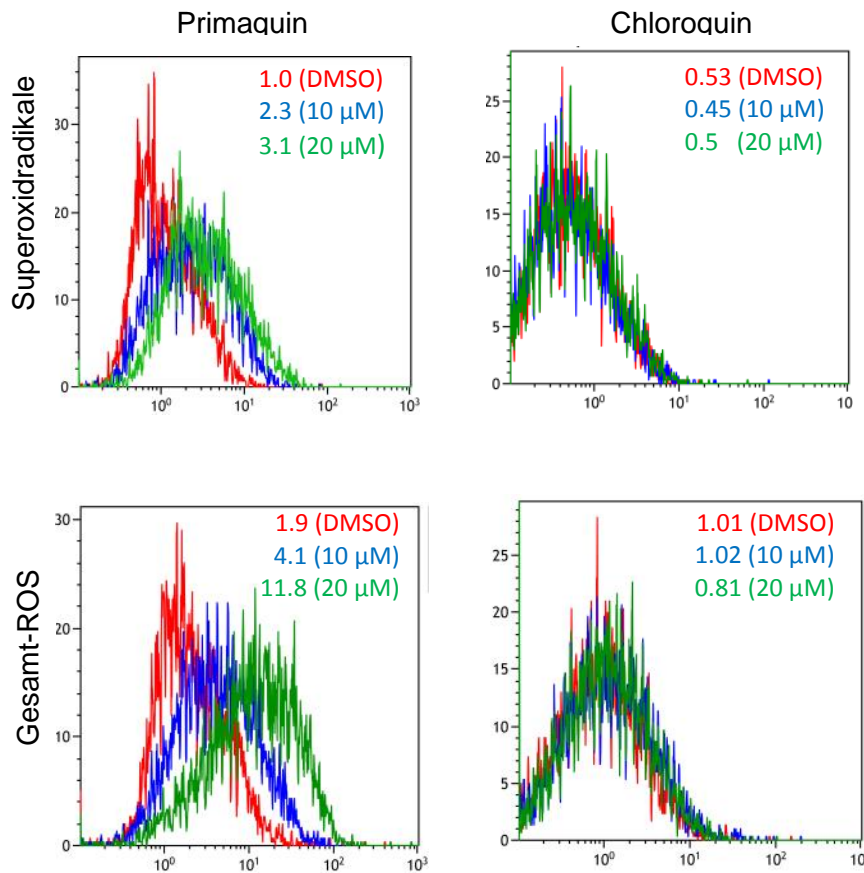


### -Ergebnisse-

Die Menge der durch Primaquin induzierten Superoxidradikale und die Gesamtmenge aller reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde zusätzlich quantitativ mittels FACS-Analysen bestimmt. In diesem Experiment wurde Chloroquin als vergleichende Substanz mit einbezogen.

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 48 h mit Primaquin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (blaue Kurve), sowie 20  $\mu\text{M}$  (grüne Kurve) inkubiert. Vergleichende Analysen wurden mit Chloroquin in den gleichen Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. In beiden Experimenten wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle (rote Kurve) verwendet. Das in Abb. 14 vorliegende Histogramm gibt die Häufigkeitsverteilung der Messsignale der hier untersuchten Parameter, Superoxidradikale und die Gesamtmenge aller reaktiven Sauerstoffspezies, wieder.

Die Histogrammdarstellung zeigt, dass die Menge gemessener Superoxidradikale in Primaquin behandelten Zellen bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (blaue Kurve) ansteigt und konzentrationsabhängig bei höheren Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  (grüne Kurve) weiter zunimmt, was durch eine Zunahme der medianen Fluoreszenzintensität auf der X-Achse gemessen wird. Auch die Gesamtmenge der ROS in Primaquin behandelten Zellen weist eine Konzentrationsabhängigkeit auf, wobei die Menge der Gesamt-ROS bei steigender Primaquinkonzentration stärker zunimmt, als die der Superoxidradikale. Neben Superoxidradikalen zählen noch weitere Moleküle, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Peroxylradikale zu den ROS, sodass davon ausgegangen werden kann, dass neben Superoxidradikalen noch weitere reaktive Moleküle im Rahmen der Biotransformation entstehen. In Chloroquin behandelten Brustkrebszellen ist dagegen weder die Induktion von Superoxidradikalen, noch anderer ROS nachweisbar, woraus abgeleitet werden kann, dass die antitumorale Wirkung von Chloroquin im Gegensatz zu der von Primaquin nicht auf der Induktion von oxidativem Stress beruht.



**Abbildung 14: FACS-Analysen zum Vergleich der Induktion von Superoxidradikalen und Gesamt-ROS durch Primaquin und Chloroquin in MCF-7-Zellen.** Brustkrebszellen der Linie MCF-7 wurden für 48 h mit Primaquin oder Chloroquin (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch ein Durchflusszytometer. Chloroquin weist im Gegensatz zu Primaquin keine Induktion von ROS auf. Die jeweiligen medianen Fluoreszenzwerte sind innerhalb der Histogramme angegeben.

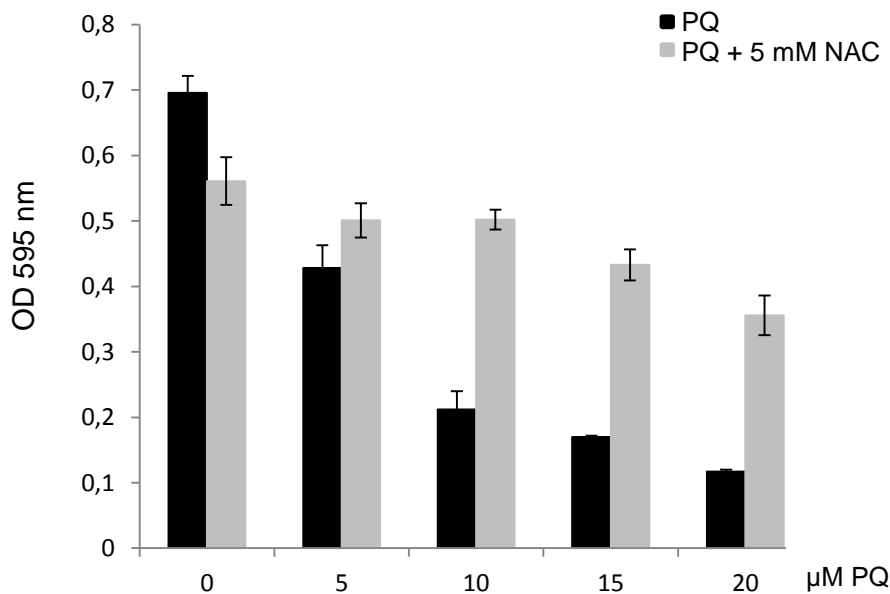


### 3.3.4.2 Zytoprotektiver Effekt von N- Acetyl- Cystein

In den Abbildungen 13 und 14 konnte beobachtet werden, dass Primaquin zeit- und konzentrationsabhängig oxidativen Stress in Brustkrebszellen induziert. Zur Verifikation dieser Ergebnisse wurde mittels MTT-Assay untersucht, ob das Antioxidanz N-Acetyl-Cystein einen zytoprotektiven Effekt auf Primaquin behandelte Zellen hat.

MCF-7-Zellen wurden entweder nur mit Primaquin (schwarze Balken) in aufsteigenden Konzentrationen (10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) oder mit Primaquin und dem Antioxidanz N-Acetyl-Cystein (graue Balken) in Konzentrationen von jeweils 5 mM für 72 Stunden inkubiert und die Zellüberlebensrate mittels MTT-Assay analysiert.

N-Acetyl-Cystein hatte in allen untersuchten Konzentrationen eine zytoprotektive Wirkung auf Primaquin behandelte Zellen. Die Ergebnisse des MTT-Assays verdeutlichen, dass die pro-oxidativen Eigenschaften von Primaquin durch Zugabe des Antioxidanz N-Acetyl-Cystein abgeschwächt werden können. Die zytoprotektive Wirkung von N-Acetyl-Cystein auf Primaquin behandelte Tumorzellen bestätigt damit die in Abbildungen 13 und 14 beobachteten Ergebnisse, nämlich die durch Primaquin induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Induktion von oxidativem Stress in Brustkrebszellen.



**Abbildung 15: Zytoprotektiver Effekt von N-Acetyl-Cystein.** MCF-7 Zellen wurden in aufsteigenden Konzentrationen (10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) mit Primaquin allein (schwarze Balken), sowie in Kombination mit dem Antioxidanz N-Acetyl-Cystein in Konzentrationen von 5 mM (graue Balken) für 72 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Reader bei 595 nm.

### **3.4 Expression von Cytochrom P450-Isoenzymen in Brustkrebszellen und Induktion durch Primaquin**

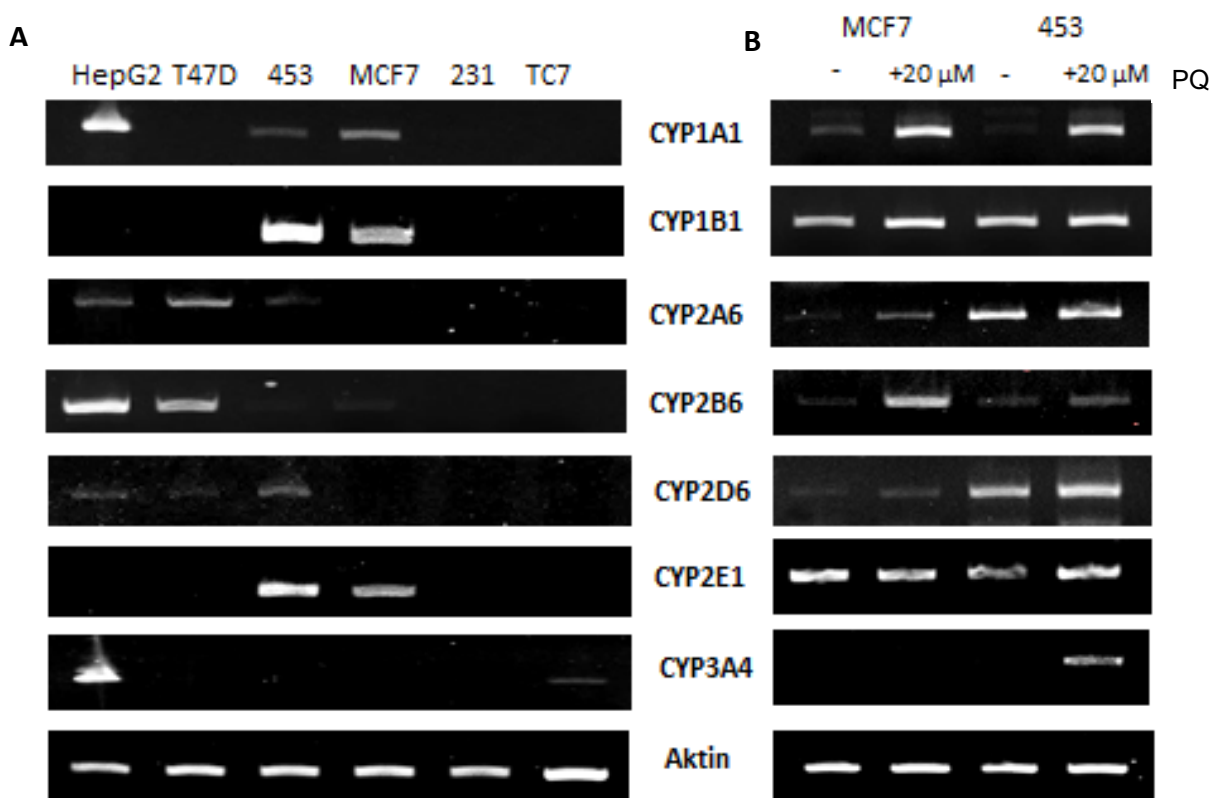
Die Biotransformation in der Leber stellt den Hauptabbauweg von Primaquin dar. Ein geringer Anteil des Medikaments wird dabei über Monooxygenasen des Cytochrom P450-Systems metabolisiert, wobei als Nebenreaktion reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Metabolite entstehen, die ursächlich sind für die Hämotoxizität. Da die Expression der Cytochrom P450-Enzyme in Krebszellen umstritten ist, wurde die Genexpression der häufigsten Isoenzyme an Mammakarzinomzelllinien und vergleichend an anderen Geweben, wie Enterozyten der Linie TC7, sowie transformierten Leberzellen der Linie HepG2 untersucht, da Leberzellen bekannterweise hohe Konzentrationen an CYP450-Enzymen exprimieren.

Für die Experimente in Abb. 16 A wurde die RNA aus den unbehandelten Zellen mit Hilfe des Extraktionskits (Direct-zol™ RNA MiniPrep) isoliert, in cDNA umgeschrieben und über eine semi-quantitative RT-PCR analysiert. Es ist zu erkennen, dass alle Mammakarzinomzelllinien mit Ausnahme der Linie 231 eine starke Expression diverser Cytochrom-Isoenzyme aufweisen, jedoch mit unterschiedlichem Verteilungsmuster.

Auch in HepG2 Zellen lässt sich die Genexpression von CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2A6 und CYP1A1 nachweisen. Enterozyten der Linie TC7 exprimieren dagegen, mit Ausnahme von CYP3A4, keine der untersuchten Isoenzyme. Als Haushaltsgen wurde Aktin verwendet, das als Protein des Zytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen etwa gleich stark exprimiert und nicht reguliert wird.

In Abb.16 B wurde die Regulation der Transkription der selben Isoenzyme unter Zugabe von Primaquin an zwei Mammakarzinomzelllinien untersucht. Zellen der Linie MCF-7 und MDA-MB-453 wurden für 8 Stunden mit 20 µM Primaquin inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Die unbehandelten Zellen stellen eine Negativkontrolle dar.

CYP1A1 wird in MCF-7-Zellen unter Primaquin stark hochreguliert und in 453-Zellen sogar induziert. Auch die Transkriptionsrate von CYP2B6 wird in MCF-7-Zellen unter Primaquin stark, in 453-Zellen dagegen nur schwach hochreguliert. CYP2A6 wird in MCF-7 Zellen leicht hochreguliert, in 453-Zellen findet dagegen keine verstärkte Expression statt. Auf CYP2D6 hat Primaquin sowohl in MCF-7, als auch in 453-Zellen einen geringfügig hochregulierenden Einfluss. CYP3A4 wird nur in 453-Zellen unter Primaquineinfluss hochreguliert. CYP1B1 wird von beiden Zelllinien stark exprimiert und die Expression durch Primaquin weiter verstärkt. Eine Hochregulation konnte auch für CYP2E1 in 453-Zellen durch Primaquin beobachtet werden.



**Abbildung 16: Vergleich der Expression von Cytochrom P450 Isoenzymen in Brustkrebszellen, Enterozyten und transformierten Leberzellen (A), sowie deren Induktion durch Primaquin in MCF-7 und MDA-MB-453- Zellen (B).** Die Mammakarzinomzelllinien T47-D, MDA-MB-453, MCF-7 und MDA-MB-231, sowie Enterozyten der Linie TC7 und transformierte Leberzellen der Linie HepG2 wurden bezüglich der Genexpression verschiedener Isoenzyme der Cytochrom P450-Familie analysiert. An MCF-7 und MDA-MB-453- Zellen wurde zusätzlich die Regulation der Gentranskription unter Zugabe von 20 µM Primaquin untersucht.

### 3.5 Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Primaquin durch Auranofin

Das Antirheumatikum Auranofin ist für seine Inhibition der Thioredoxin-Reduktase, als Teil des antioxidativen Systems, bekannt und wird daher zur Kombination mit pro-oxidativen Chemotherapeutika empfohlen, um deren antitumorale Wirkung zu verstärken (Kast et al. 2013; Brüning and Kast 2014).

Im letzten Teil der Arbeit wurde Primaquin als pro-oxidative Substanz mit Auranofin kombiniert, um durch einen möglichen wirkungsverstärkenden Effekt eventuell die Dosis reduzieren zu können. Die Auswirkung auf das Zellüberleben wurde mittels MTT-Assay analysiert (vgl. Abb.17 A). MCF-7-Zellen wiesen über eine Konzentrationsreihe von 5 µM-

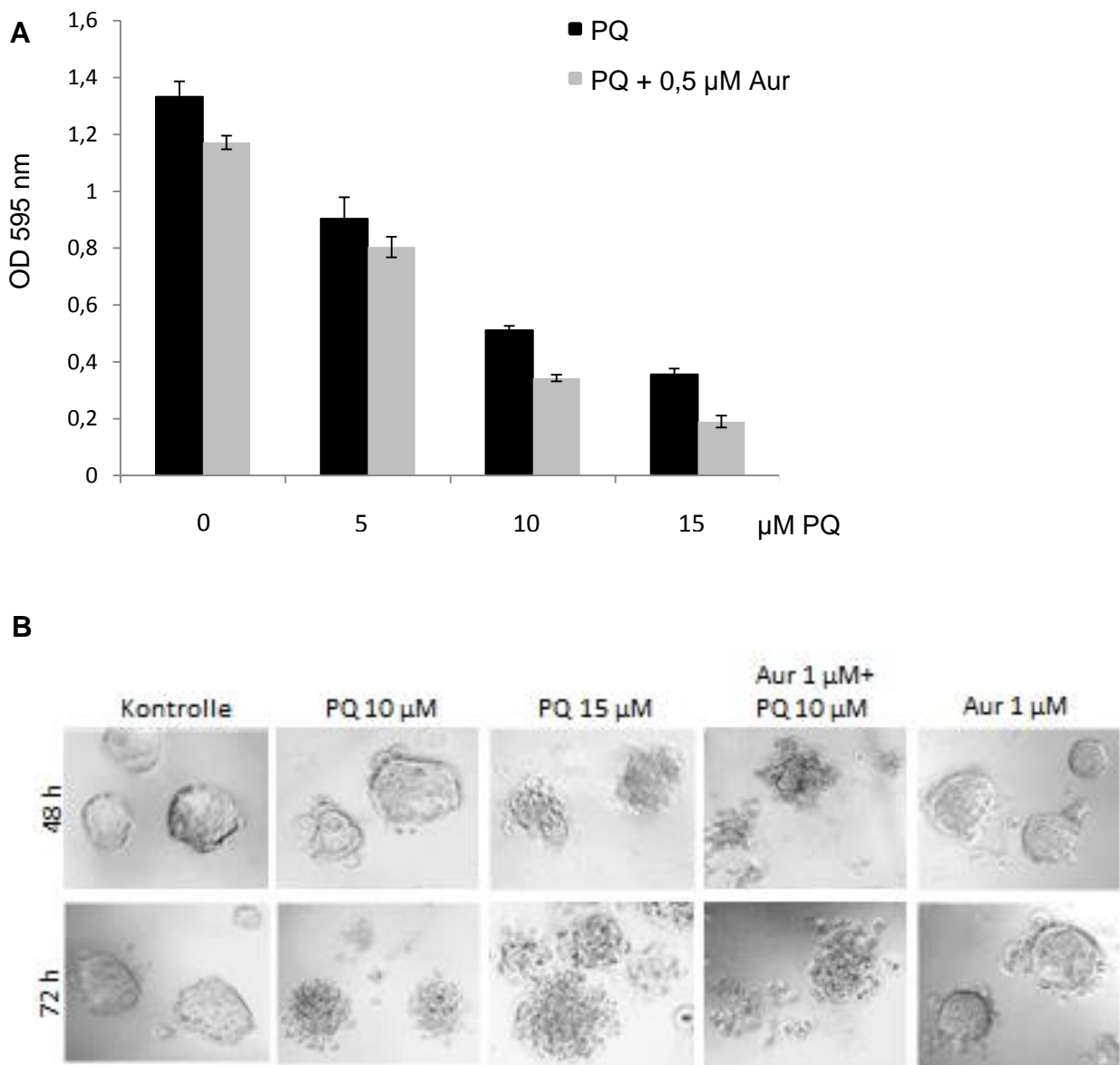
15  $\mu\text{M}$  nach 72 h Inkubationszeit eine stärkere Reduktion der Zellvitalität auf, wenn sie zusätzlich mit Auranofin als Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  inkubiert wurden (graue Balken) im Gegensatz zur alleinigen Inkubation mit Primaquin (schwarze Balken).

Tumorzellen verhalten sich in einer 3-D-Zellkultur, wie sie auch bei Tumoren in vivo zu finden ist, häufig anders als in einer zweidimensionalen Monolayer-Zellkultur. Zum Beispiel weisen Tumorzellen in einer 3-D-Kultur häufiger Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika auf, auf Grund verminderter Penetration und Diffusion in tief gelegene Schichten des Tumors, geringerer Wachstumsrate auf Grund sehr hoher Zelldichte und schlechten Wachstumsbedingungen wie niedrigem pH-Wert und Sauerstoffmangel (Francia et al. 2004). Um die Bedingungen von einem in vivo Tumor besser nachzuahmen, wie z.B. den dort herrschenden Nährstoff-, Metabolit- und Sauerstoffgradienten, wurde die antitumorale Wirkung von Primaquin auch an Tumorzell-Sphäroiden in einer 3-D-Zellkultur als Zwischenstufe zum Tiermodel untersucht.

MCF-7-Zellen wurden auf extrazellulärer Matrix (Matrigel, Geltrex™) angesetzt, bis sich kugelige dreidimensionale Tumorsphäroide gebildet hatten und entweder mit Primaquin in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 15  $\mu\text{M}$  oder mit Auranofin in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde nicht mit Medikamenten inkubiert und eine weitere Gruppe wurde mit einer Kombination aus Primaquin 10  $\mu\text{M}$  und Auranofin 1  $\mu\text{M}$  inkubiert.

In Abb. 17 B ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 72 h sowohl die Tumorsphäroide, die mit 15  $\mu\text{M}$ , als auch diejenigen, die mit 10  $\mu\text{M}$  Primaquin behandelt worden sind, komplett zerstört wurden. Hingegen wurden die Sphäroide, die mit Auranofin allein behandelt wurden nach der gleichen Inkubationszeit nur geringfügig zerstört und multizelluläre Komplexe sind noch zu erkennen. Zu beobachten ist außerdem, dass die Gruppe, die mit beiden Medikamenten behandelt wurde (PQ 10  $\mu\text{M}$  + Aur 1  $\mu\text{M}$ ) bereits nach einer kürzeren Expositionsdauer von 48 h den gleichen zytotoxischen Effekt aufweist, wie die Gruppe, die für 72 h mit Primaquin 10  $\mu\text{M}$  allein inkubiert wurde. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse des MTT-Assays aus Abb.17 A, nämlich dass sich die antitumorale Wirkung von Primaquin durch Kombination mit dem Antirheumatikum Auranofin verstärken lässt, wodurch die Expositionsdauer bei Verwendung der Kombination beider Medikamente verkürzt werden kann.

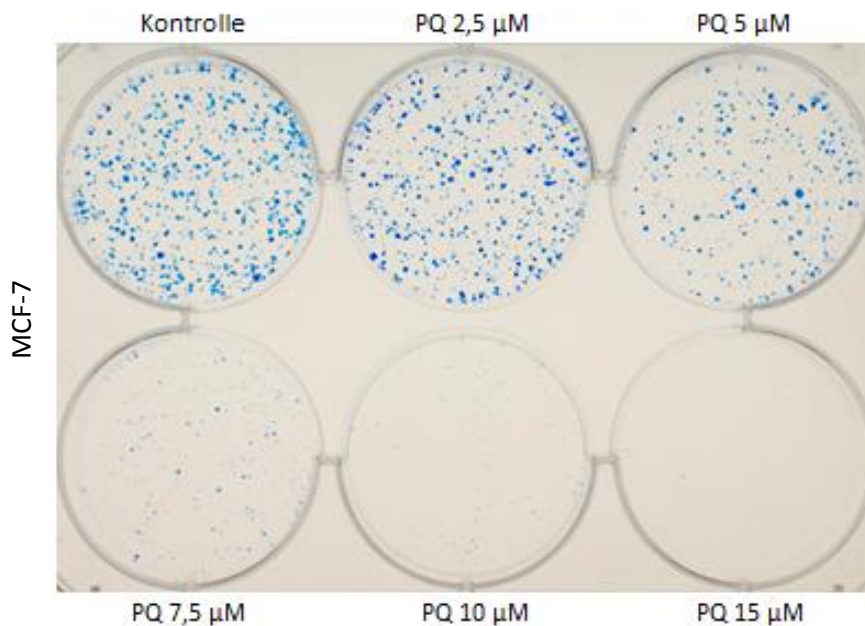
-Ergebnisse-



**Abbildung 17: Verstärkung der antitumoralen Wirkung von Primaquin durch Auranofin an MCF-7-Zellen.** MCF-7-Zellen wurden mit steigenden Primaquinkonzentrationen (5 µM, 10 µM, 15 µM) mit und ohne Auranofin (0,5 µM) für 72 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Reader (A). MCF-7-Zellen wurden auf extrazellulärer Matrix angesetzt, bis sich dreidimensionale Tumor-Sphäroide bildeten und mit Primaquin bzw. Auranofin inkubiert. Die Zellen wurden nach 48 h und nach 72 h bei 40-facher Vergrößerung fotografiert (B).

### 3.6 Langfristiger wachstumshemmender Effekt von Primaquin

Die maximal gemessene Primaquinkonzentration im Blut bei Anwendung als Malariamedikament reicht zwischen 53 ng/ml (c max), entspricht 0,21  $\mu$ M, bei Einnahme von 15 mg/ Tag bis hin zu 167 ng/ml (c max), entspricht 0,65  $\mu$ M, bei Einnahme von 45 mg/ Tag. Da im MTT-Assay in Abb. 6 deutlich höhere Konzentrationen verwendet wurden, wurde die langfristige wachstumshemmende Wirkung in einem Klonal-Assay untersucht. Zellen der Linie MCF-7 wurden mit Primaquinkonzentrationen von 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M für 96 h inkubiert und mit Coomassieblau gefärbt. Dabei ist bereits eine deutliche Reduktion der Zellklone ab einer Konzentration von 7,5  $\mu$ M nach 96 h zu erkennen.



**Abbildung 18: Langfristiger wachstumshemmender Effekt von Primaquin auf MCF-7-Zellen.** MCF-7-Zellen wurden in 6-Well-Platten angesetzt und für 96 h mit steigenden Primaquin Konzentrationen (2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Zellklone wurden mit Coomassie brilliant Blau gefärbt und fotografiert.

## 4 Diskussion

Brustkrebs ist die häufigste weibliche Krebserkrankung und die weltweit häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau. Die steigenden Inzidenzraten in Industrie- und Entwicklungsländern, sowie das Aufkommen von Resistenzen gegenüber derzeit eingesetzte Chemotherapeutika, machen die Suche nach neuen Substanzen gegen molekulare Zielstrukturen in Form einer „targeted therapy“ zu einem anhaltend wichtigen Gegenstand in der Forschung. Durch das Prinzip der sogenannten Medikamentenrepositionierung können neue Medikamente für die Krebstherapie in einer zeit- und kostensparenden Weise entwickelt werden, indem der Vorteil des vorhandenen Wissens bereits eingesetzter Medikamente zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik, den Nebenwirkungen und die erprobte Sicherheit im Menschen für neue Indikationen genutzt wird. Das Forschungslabor um Prof. Mylonas konnte bereits für einige Medikamente, z.B. den HIV-Protease-Inhibitor Nelfinavir und das früher zur Unterstützung der Alkoholentwöhnung eingesetzte Disulfiram, antitumorale Wirkungen an Mammakarzinomzellen und weiteren gynäkologischen Krebszellen nachweisen (Brüning et al. 2009; Brüning et al. 2010; Papaioannou et al. 2014).

Im Sinne einer Medikamentenrepositionierung wurde in dieser Arbeit das Malariamedikament Primaquin (N-(6-Methoxyquinolin-8-yl)pentan-1,4-diamin) bezüglich seiner antitumoralen Wirkung auf Brustkrebszellen untersucht. Auf Grund seiner erprobten Sicherheit und bereits bekannten pharmakodynamischen Eigenschaften, könnte sein Einsatz als potentiell Medikament in der Krebstherapie stark beschleunigt werden, sobald die zu Grunde liegenden Mechanismen der antitumoralen Wirkung bekannt sind.

Quinoline sind für ihre Aktivität gegen Protozoeninfektionen, wie Malaria (Wiesner et al. 2003) und Leishmaniose (Dade et al. 2001), opportunistische Infektionen, wie der Pneumocystis jirovecii Pneumonie (Toma et al. 1998) und zum Teil auch bereits für eine antitumorale Wirkung bekannt (Zhou et al. 2000; Solomon and Lee 2009; Kimura et al. 2013). Die Krebszellen sensitivierende Wirkung des 4-Aminoquinolins Chloroquin, als Autophagie Inhibitor, wurde in den letzten Jahren gut erforscht und zeigte bereits in vitro und in vivo vielversprechende Erfolge (Egger et al. 2013; Kimura et al. 2013). Allerdings kann die Einnahme von Chloroquin mit Nebenwirkungen wie irreversibler Retinopathie und in seltenen Fällen mit Kardiotoxizität einhergehen (Foley and Tilley 1998). Die Untersuchung weiterer Malariamedikamente der gleichen Stoffgruppe, jedoch mit besserem Nebenwirkungsprofil, auf ihr mögliches Potential für die Onkotherapie erweist sich daher als sinnvoll. Im Vergleich zu Chloroquin existieren bis heute nur wenige Studien, die die antitumorale Wirkung von 8-Aminoquinolinen, mit deren Hauptvertreter Primaquin, untersucht haben.

Die Untersuchung der morphologischen Veränderungen und biochemischen Mechanismen, die zum Primaquin induzierten Zelltod führten, waren Schwerpunkt dieser Arbeit und wurden anhand fluoreszenzmikroskopischer und molekularbiologischer Analysen durchgeführt. Dabei konnten wir zeigen, dass Primaquin im Vergleich zu Chloroquin eine stärkere antiproliferative Wirkung auf Mammakarzinomzellen besitzt, die sich, trotz der Strukturähnlichkeit der beiden Medikamente, wesentlich von der des Chloroquins unterscheidet. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Primaquin induzierte Zelltod in Brustkrebszellen weder durch eine Inhibition von Autophagie, wie bei Chloroquin, noch der HSP90 Aktivität und Inhibierung des HER-2-Signalwegs erfolgt, sondern durch eine CYP450-abhängige Induktion von Superoxidradikalen und weiteren reaktiven Sauerstoffspezies. Der antitumorale Effekt dieser pro-oxidativen Substanz konnte durch eine Kombination mit dem Antirheumatikum Auranofin, als Inhibitor der Thiothionin-Reduktase, weiter verstärkt werden.

#### **4.1 Voruntersuchungen zur antitumoralen Wirkung von Quinolinen**

Die antitumorale Wirkung von Quinolinen, besonders auf Brustkrebszellen, war auch Forschungsgegenstand der Gruppe Gakhar et al. Diese identifizierte einige Primaquinanaloga als Aktivatoren von gap junctions, darunter das substituierte Quinolin PQ1 (6-methoxy-8-[(3-aminopropyl)amino]-4-methyl-5-(3-trifluoromethylphenyloxy)quinoline) mit einer hohen Affinität für das gap junction Protein Connexin 43 (Gakhar et al. 2008). Gap junctions stellen die einzige Spezialisierung der Zellmembran dar, über die benachbarte Zellen durch den Austausch kleiner Moleküle und Ionen miteinander kommunizieren können. Der Austausch über die interzellulären Membrankanäle wird als „gap junctional intercellular communication“ (GJIC) bezeichnet (Dagli 2007). Gap junctions sind durch den interzellulären Austausch von Molekülen an der Regulation von Zellproliferation- und Differenzierung, dem Zelltod, sowie der Zellhomöostase beteiligt (Ruch 1994). Tumorzellen weisen häufig eine verminderte Anzahl oder veränderte gap junctions auf und eine negative Korrelation zwischen der interzellulären Kommunikation und dem Zellwachstum (Loewenstein and Kanno 1966).

In vitro Untersuchungen mit dem Primaquinanalogon PQ1 ergaben, dass PQ1 als Aktivator von gap junctions die interzelluläre Kommunikation in T47-D-Mammakarzinomzellen verstärkt (Gakhar et al. 2008), die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 hemmt (Perchellet 2010) und durch eine verstärkte Expression des proapoptotischen Proteins Bax und Aktivierung von Caspase 3, 8 und 9 die Apoptose in T47-D- Zellen induziert (Ding and Nguyen 2013). Daneben konnte eine Spaltung von PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase), als früher Apoptosemarker, und eine internukleosomale Fragmentierung der DNA in Leukämiezellen beobachtet werden. Zur weiteren Identifizierung von molekularen Zielstrukturen wurden Immundetektions- und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Diese



zeigten jedoch keine Inhibierung der HSP90 Aktivität und des HER1/2-Signalwegs durch PQ1 in Epidermoid (A-431)- und Mammakarzinomzellen (SK-BR-3) (Perchellet 2010).

Neben in vitro Studien konnte auch in einem Xenograft Mausmodel mit T47-D tragenden Tumoren eine Reduktion der Tumormasse um 70 % 6 Tage nach der Verabreichung von PQ1 beobachtet werden (Gakhar et al. 2008). Allerdings war der Umfang der eingesetzten Versuchstiere nicht ausreichend und die Studie wurde nach 6 Tagen auf Grund des schlechten Zustands der Kontrolltiere abgebrochen, sodass daraus keine allgemeine Wirksamkeit für das Primaquinanalogon in vivo abgeleitet werden kann.

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von Primaquin auf den HER1/ 2-Signalweg in Tumorzellen untersucht. In einer Vorpublikation von Al-Sha'ér und Taha wurden mittels ligandenbasierter dreidimensionaler Pharmakophore und einem QSAR (quantitative structure-activity relationship)- Model neue HSP90 Inhibitoren identifiziert, darunter das Malariamedikament Primaquin. Das Hitzeschockprotein 90 besitzt als molekulares Chaperon eine wichtige Funktion in der Stabilisierung und korrekten Faltung sogenannter „client Proteine“, von denen viele Schlüsselproteine in onkogenen Signalwegen darstellen. Eine Inhibition der HSP90 Aktivität mit folgender Destabilisierung und proteasomalem Abbau dieser „client Proteine“ ermöglicht somit die gleichzeitige Inhibierung mehrerer onkogener Signalwege innerhalb einer Zelle und stellt dadurch eine besonders interessante molekulare Zielstruktur in der Krebstherapie dar. In Western-Blot-Analysen an MCF-7 und MDA-MB-453-Zellen konnten wir jedoch keine Abnahme der Proteinexpression der HSP90 „client Proteine“ HER-2, Glukokortikoidrezeptor und HSF-1 (heat shock factor 1) nach 24 h Inkubation mit Primaquin in Konzentrationen von 5- 20 µM beobachten. Dagegen kam es nach Inkubation mit einer Positivkontrolle (1 µg/µl Geldanamycin bzw. Radicol) zu einer drastischen Abnahme der gleichen Proteine. Die Expression von HSP90 blieb unverändert, bzw. zeigte sogar eine leichte Hochregulation bei der Positivkontrolle. Diese Hochregulation könnte als Gegenregulationsmechanismus auf Grund der gehemmten HSP90 Aktivität erfolgt sein. Anhand unserer Ergebnisse können wir in Übereinstimmung mit Perchellet et al. schlussfolgern, dass das Hitzeschockprotein 90, im Gegensatz zur von Al-Sha'ér und Taha postulierten Hypothese, keine molekulare Zielstruktur von Primaquin darstellt und dessen antitumorale Wirkung nicht auf einer Inhibition des HER1/2-Signalwegs beruht.

#### **4.2 Primaquin induzierter Zelltod: Apoptose versus Nekrose**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir einen starken Zusammenbruch des inneren mitochondrialen Membranpotentials in Primaquin behandelten MCF-7-Zellen beobachten. Eine Beeinträchtigung der parasitären Mitochondrienfunktion, durch Störung der Elektronentransportkette, mit Schwellung der Mitochondrien und Störung des Metabolismus,

wird auch als mögliche antiinfektive Wirkung von Primaquin diskutiert (Foley and Tilley 1998; Fernandes et al. 2009; Vale et al. 2009).

Das Potential über der inneren Mitochondrienmembran besteht aus einem elektrochemischen Gradienten zwischen der Mitochondrienmatrix und dem Intermembranraum, der durch die Protonenpumpen der Atmungskette aufgebaut wird. Dieser elektrochemische Gradient ist die treibende Kraft für die ATP-Synthase und ermöglicht dadurch die Energiegewinnung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung. Ein Zusammenbruch dieses elektrochemischen Gradienten kann als Folge einer erhöhten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran auftreten, z.B. durch porenbildende Proteine der Bcl-2-Familie (Bax, Bak), und somit ein frühes Ereignis der Apoptose darstellen (Kroemer et al. 1998; Galluzzi et al. 2012). Allerdings kann eine Depolarisation des Membranpotentials auch unter anderen Umständen auftreten, z.B. durch eine Hemmung der Zellatmung durch Störung der Elektronentransportkette und führt durch einen Mangel an ATP mit gleichzeitiger Zunahme von ROS zu einer bioenergetischen Krise und möglicherweise zum Zelltod (Kroemer et al. 2007).

Apoptose und Nekrose wurden lange Zeit als zwei voneinander getrennte Formen des Zelltods angesehen, mit jeweils unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Kennzeichen (Majno and Joris 1995).

Die Apoptose, als genetisch vorprogrammiertes Suizidprogramm, ist ein energieabhängiger und streng kontrollierter Prozess, der durch eine Reihe von physiologischen, aber auch pathologischen Stimuli, wie Hitzeschock, Hypoxie oder oxidativem Stress, ausgelöst werden kann und besitzt wichtige physiologische Funktionen, z.B. in der Kontrolle der Zellhomöostase, von der Embryonalentwicklung bis zum Altern, sowie in der korrekten Entwicklung und Funktion des Immun- und Nervensystems (Elmore 2007). Eine Fehlregulation, in Form einer verstärkten oder verminderten Apoptose, kann zu Pathologien führen, wie neurodegenerativen Erkrankungen (M. Alzheimer) (Ethell and Buhler 2003), Autoimmunerkrankungen (AIDS) (Li et al. 1995) oder zur Entwicklung von Tumoren beitragen (Kerr et al. 1994). Die Apoptose geht mit charakteristischen morphologischen Veränderungen einher: Zellschrumpfung, Kondensierung des Chromatins (Pyknose), Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis), Vorwölbungen der Zellmembran „membrane blebbing“, sowie einer Kondensierung des Zytoplasmas mit Ausbildung dicht gepackter Apoptosekörperchen, die kondensierte, aber weiterhin intakte Organellen enthalten und von einer weiterhin intakten Membran umgeben sind (Kerr et al. 1972). Biochemische Veränderungen beinhalten die Aktivierung spezifischer cysteinhaltiger Proteasen (Caspasen) mit folgender Spaltung von Zellproteinen, eine internukleosomale Fragmentierung der DNA (Bortner et al. 1995), sowie eine Translokation von Phosphatidylserin von der zytosolischen Seite an die Außenseite der Zellmembran, was dort als Erkennungssignal für Phagozyten fungiert (Van den Eijnde, S M et al. 1997). Die schnelle Aufnahme apoptotischer Zellen

durch phagozytische Nachbarzellen verhindert eine Ruptur der Zellmembran und damit eine Entzündungsreaktion im Gewebe (Kurosaka et al. 2003).

Der Prozess der Nekrose wird der Apoptose meist gegenübergestellt in Form eines akzidentellen, unkontrollierten Zelltods und als passive Reaktion auf akute oder schwere Zellschäden, wie abrupten Nährstoffentzug, Anoxie, Hitze, Strahlung oder Detergenzien. Nekrotische Zellen sind gekennzeichnet durch eine Zellschwellung, sowie eine Schwellung der Organellen, Membranruptur und einem Auslauf des Zytoplasmainshalts in das umliegende Gewebe mit nachfolgender Entzündungsreaktion (Majno and Joris 1995).

Obwohl die beiden Hauptformen des Zelltods, Apoptose und Nekrose, in ihrer klassischen Ausprägung klar zu unterscheiden sind, verläuft der Zelltod nicht unter allen Umständen uniform und eine strikte Trennung ist somit nicht immer möglich. Von einigen Autoren wird daher vorgeschlagen, die klassischen Formen der Apoptose und Nekrose als zwei Extreme eines Kontinuums von vielen möglichen morphologischen und biochemischen Formen des Zelltods zu betrachten, die, zumindest in der Anfangsphase, auch Gemeinsamkeiten aufweisen können (Leist and Nicotera 1997; Formigli et al. 2000; Zeiss 2003). Der gleiche Stimulus kann mitunter sowohl in einem apoptotischen, als auch nekrotischen Zelltod münden. Die eingeschlagene Richtung wird dabei weniger von der Art des Auslösers, sondern von seiner Intensität bestimmt (Bonfoco et al. 1995), sowie von weiteren nachgeschalteten Regulatoren, wie dem ATP-Gehalt der Zelle (Leist et al. 1997) und der Möglichkeit der Caspaseaktivierung (Zeiss 2003). Zum Beispiel kann ein Mangel an ATP oder die Inhibierung von Caspasen, trotz eines apoptotischen Stimulus, zu einem nekrotischen Zelltod führen.

In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass der in Tumorzellen induzierte Zelltod durch Primaquin und synthetische Primaquinanaloga einem programmierten Zelltod (Apoptose) folgt (Gakhar et al. 2008; Gakhar et al. 2010; Heiniger et al. 2010; Perchellet 2010; Ding and Nguyen 2013). In diesen Publikationen konnte eine Aktivierung von Caspasen (Gakhar et al. 2008; Perchellet 2010; Ding and Nguyen 2013), DNA-Fragmentierung und Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP (Perchellet 2010) beobachtet werden.

In unseren Untersuchungen konnten wir eine Chromatinkondensierung und mit der JC-1/Trypanblau Cofärbung einen starken Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in MCF-7-Zellen nachweisen, was der Permeabilitätszunahme und Färbung mit Trypanblau vorausging.

Allerdings fehlten lichtmikroskopisch klassische morphologische Kennzeichen einer Apoptose, wie eine Abrundung der Zellen, Zellschrumpfung, Zellkernfragmentierung, „membrane blebbing“ und Apoptosekörperchen. Auch molekularbiologische Untersuchungen ergaben in unserer Arbeitsgruppe keine Spaltung von PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase), Spaltung von Caspasen oder eine verminderte Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 (Ergebnisse nicht gezeigt) als Hinweise eines klassischen programmierten

Zelltods. Zusätzlich zeigte auch die Annexin-V-Färbung nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen.

MCF-7-Zellen ließen sich nach 48 h Inkubation mit Primaquin vereinzelt mit Trypanblau und Propidiumiodid anfärben. Da diese Farbstoffe für intakte Membranen impermeabel sind und nur Zellen mit löchriger Membran passieren können, deuten diese Befunde auf einen nekroseähnlichen Zelltod durch Primaquin hin. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials weist in diesem Zusammenhang eher auf eine Störung der ATP-Synthese und einen zellulären Energieverlust hin, infolge dessen keine Apoptose mehr möglich ist und schließlich ein nekroseähnlicher Zelltod eingeleitet wird.

Auffallend war jedoch die Diskrepanz zwischen der guten Reduktion der Zellvitalität maligner Brustkrebszellen im MTT-Assay nach 72 h und der vergleichsweise geringen Anzahl nachweisbarer Trypanblau bzw. Propidiumiodid gefärbter nekrotischer Zellen. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass es zwischen dem Zelltod, als irreversiblen Endpunkt, und dem vorausgehenden Prozess des Sterbens einen Unterschied gibt. Eine tote Zelle, die durch einen Verlust ihrer Membranintegrität, erloschenen Metabolismus oder zellulärer und nukleärer Fragmentierung gekennzeichnet ist (Blagosklonny 2000; Kroemer et al. 2005), befindet sich bis zum Erreichen dieses Endpunkts in einer Phase, in der sie durchaus noch Kennzeichen einer lebenden Zelle aufweisen kann, wie z.B. die fehlende Anfärbbarkeit mit Trypanblau oder Propidiumiodid, auf Grund einer noch intakten Zellmembran (Blagosklonny 2000). Zusätzlich muss man bedenken, dass das Zellsterben innerhalb einer Zellpopulation kein synchroner Prozess ist und der Analysezeitpunkt eher eine Momentaufnahme darstellt, bei der sich die Zellen in unterschiedlichen Stadien des Sterbeprozesses befinden und somit nicht alle Zellen als vollständig tot (PI/ Trypanblau gefärbt) erfasst werden (Kroemer et al. 2005).

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass der Primaquin induzierte Zelltod in Brustkrebszellen weder einem klassischen apoptotischen, noch einem klassischen nekrotischen Weg folgt und muss daher als undefiniert angesehen werden, was jedoch durchaus möglich ist, wenn man bedenkt, dass Apoptose und Nekrose in ihrer klassischen Ausprägung eben nur die beiden Extreme einer großen Breite an möglichen morphologischen und biochemischen Formen des Zelltods darstellen, worunter es auch Überschneidungen gibt, die z.B. von einigen Autoren als „Aponekrose“ bezeichnet werden (Formigli et al. 2000).

Beim Vergleich mit den oben genannten Studien muss man berücksichtigen, dass das dort eingesetzte synthetische Primaquinanalogon PQ1 zwar das gleiche Quinolingerüst wie die Originalsubstanz besitzt, jedoch an verschiedenen Stellen modifiziert worden ist. Die substituierten Seitenketten können dem Analogon molekulare Eigenschaften verleihen, die auf die Originalsubstanz Primaquin nicht zutreffen, wie z.B. die proapoptotischen Eigenschaften. Dieser Aspekt muss beim Vergleich mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen bedacht werden und könnte eine mögliche Erklärung für die gefundenen Diskrepanzen bieten.

#### **4.3 Überexpression von CYP450-Enzymen in Tumorzellen: Zielstruktur für die selektive Aktivierung von Primaquin in Brustkrebszellen ?**

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass der durch Primaquin induzierte Zelltod in Brustkrebszellen durch die Bildung von Superoxidradikalen und weiteren ROS erfolgt, die als Nebenprodukt des CYP450-Metabolismus mit Bildung redox-aktiver Metabolite entstehen. Eine bekannte dosislimitierende Nebenwirkung von Primaquin ist die Auslösung akuter hämolytischer Anämien bei Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Als Ursache dieser Hämotoxizität wurden bereits reaktive Metabolite beschrieben, welche im Rahmen der Biotransformation über Cytochrom-P450-Enzyme entstehen (Ganesan et al. 2009). CYP450-Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren, da sie zahlreiche Prokarzinogene metabolisieren. Außerdem beeinflussen sie den Erfolg der Chemotherapie. Alkylanzien, wie Cyclophosphamid und Ifosphamid benötigen z.B. die Aktivierung über CYP450-Enzyme (Murray 2000). Andererseits können sie auch diverse Zytostatika inaktivieren und in Folge einer verstärkten Expression zur Entwicklung von Resistenzen beitragen (McFadyen et al. 2001; Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). Während der Hauptanteil dieser Enzyme in der Leber lokalisiert ist, existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben bezüglich der CYP450-Expression in Brustkrebszellen. Einerseits finden sich Studien über eine verminderte oder gleichwertige Expression in Mammakarzinomen, verglichen mit den dazugehörigen nicht malignen Brustdrüsengeweben (Iskan et al. 2001; El-Rayes et al. 2003). Andererseits wurde von einigen Autoren die Expression bzw. sogar Überexpression verschiedener CYP450-Isoenzyme in Mammakarzinomen beschrieben, z.B. CYP1A, CYP1B1, CYP2C und CYP3A (Murray 2000). Eine umfangreiche Studie zur CYP450 Expression in Mammakarzinomen wurde 2006 von Haas et al. durchgeführt. Diese untersuchte immunhistochemisch die Proteinexpression von CYP450-Enzymen an primären Mammakarzinomen von 393 Patientinnen einer deutschen GENICA Fall-Kontroll-Studie, sowie den Zusammenhang mit tumorcharakteristischen Merkmalen. Haas et al. konnten die Expression von CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4/5, sowie von CYP2E1, als das am stärksten exprimierte Isoenzym, in malignen Brusttumoren nachweisen. Dabei war eine starke CYP3A4/5 Expression mit Lymphknotenmetastasen assoziiert und eine Überexpression von CYP1B1 mit einer schlechten Tumordifferenzierung (Haas et al. 2006). In einer Studie aus dem Jahr 2009 wurden weitere Isoenzyme in Mammakarzinomen identifiziert, von denen CYP2S1, CYP2U1 und CYP4X1 die stärkste Expression aufwiesen. Darunter korrelierten CYP2U1, CYP4X1 und CYP4Z1 mit einem höheren Tumorgrad und CYP4V2 mit einem niedrigeren Tumorgrad. Für die Enzyme CYP2S1, CYP3A4 und CYP4V2 wurde ein Zusammenhang mit dem Überleben festgestellt, wobei ein Fehlen der Enzyme in jedem Fall mit einem besseren Überleben assoziiert war (Murray et al. 2010). Rieger et al. Identifizierten das Cytochrom CYP4Z1 als ein vornehmlich im Brustdrüsengewebe exprimiertes Enzym, das eine deutliche Überexpression in malignen Brusttumoren aufweist (Rieger et al. 2004).

Ein stark verfolgtes Ziel in der Krebsforschung ist die Entwicklung neuer Medikamente, die, durch Aktivierung oder Inhibierung bestimmter Zielstrukturen, selektiv gegen Tumorzellen gerichtet sind im Sinne einer „targeted therapy“. Die Überexpression bestimmter CYP450-Enzyme in Krebszellen, verglichen mit dem umliegenden nicht malignen Gewebe, bietet somit eine therapeutische Möglichkeit Vorläufermedikamente spezifisch in Tumorzellen zu aktivieren (Riddick et al. 2005).

Das in dieser Hinsicht am besten untersuchte Cytochrom ist das Isoenzym CYP1B1. CYP1B1 konnte als tumorspezifisches Enzym in zahlreichen, histologisch unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen werden, z.B. in Mammakarzinomen, Ovarial-, Nierenzell-, Ösophagus-, Magen- und Kolonkarzinomen, sowie in Astrozytomen und Bronchialkarzinomen (Murray et al. 1997). Obwohl die mRNA dieses Isoenzymes auch in normalen Geweben exprimiert wird, wurde der immunhistochemische Nachweis des CYP1B1 Proteins, sowie dessen erhöhte Expression nur selektiv in Tumorzellen gefunden, nicht jedoch in den zugehörigen normalen Geweben. CYP1B1 katalysiert außerdem die 4-Hydroxylierung von Östradiol (Hayes et al. 1996), welche in Mammakarzinomen verstärkt nachgewiesen werden konnte (Liehr and Ricci 1996). CYP1B1 stellt seit dem ein wichtiges Molekül in der Tumordiagnostik und für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Krebstherapie dar und wird als Biomarker für Tumore angesehen (Murray et al. 1997; McFadyen, Morag C E and Murray 2005).

Verschiedene therapeutische Strategien sind derzeit in der Entwicklung, die die tumorselektive Lokalisation und Überexpression von CYP1B1 ausnutzen. Diese umfassen die Entwicklung von Vorläufermedikamenten, die spezifisch über CYP1B1 in Krebszellen aktiviert werden, einer Immuntherapie mit CYP1B1 als Zielantigen, sowie den Einsatz von CYP1B1 Inhibitoren (McFadyen, Morag C E and Murray 2005; Gribben et al. 2005).

Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte eine starke Expression verschiedener CYP450-Gene in drei von vier untersuchten Mammakarzinomzelllinien (T47D, MDA-MB-453, MCF-7) nachgewiesen werden, jedoch fehlte diese Expression, mit Ausnahme von CYP3A4, in immortalisierten nicht malignen Enterozyten (TC7). Zusätzlich konnten wir eine Hochregulation bzw. sogar Induktion einiger CYP450-Enzyme in Zellen der Linie MDA-MB-453 und MCF-7 nach Zugabe von 20 µM Primaquin beobachten.

Primaquin benötigt als Vorläufermedikament für seine antitumorale Wirkung zunächst die Aktivierung zu seinen eigentlich toxischen Metaboliten und durch diese gebildeten Superoxidradikalen im Rahmen des CYP450 Metabolismus. Brustkrebszellen mit einem hohen Anteil an CYP450-Enzymen scheinen demnach besonders anfällig für die zytotoxische Wirkung von Primaquin zu sein, als Folge einer CYP450-abhängigen und selektiven Aktivierung des Malariamedikaments in diesen Tumorzellen. Desweiteren könnte Primaquin als Vorläufermedikament speziell in Tumoren eingesetzt werden, die, auf Grund einer Überexpression von Cytochromen, Zytostatika verstärkt inaktivieren und somit helfen Chemoresistenzen zu reduzieren.

#### 4.4 Limitation

Die in unserer Arbeit eingesetzten Primaquinkonzentrationen zur Erzielung eines antitumoralen Effektes *in vitro* lagen bei 20  $\mu\text{M}$  bzw. bei 7,5  $\mu\text{M}$  im Langzeitexperiment (Klonassay) und waren damit deutlich höher als die im Menschen gemessene maximale Plasmakonzentration von 0,21  $\mu\text{M}$  ( $c_{\text{max}}$  bei 15 mg/Tag) bzw. 0,65  $\mu\text{M}$  ( $c_{\text{max}}$  bei 45mg/Tag) (Edwards et al. 1993; Nair et al. 2012). Dies bedeutet, dass für die Krebstherapie wesentlich höhere Konzentrationen als zur Therapie und Prophylaxe der Malaria eingenommen werden müssten. Da die antitumorale Wirkung auf der Induktion von oxidativem Stress beruht, durch eine CYP450-abhängige Bildung von Superoxidradikalen, und hohe Konzentrationen dieser Phase-I-Enzyme vor allem in der Leber lokalisiert sind, ist eine wichtige Frage, welchen Effekt Primaquin als potentiell Krebsmedikament auf die Leber hat. Bei der Anwendung als Malariamedikament wurde bisher keine Hepatotoxizität beschrieben (Taylor and White 2004). Außerdem wird Primaquin speziell zur Eradikation persistierender Leberstadien (Hypnozoiten) von *Pl. vivax* und *Pl. ovale* Infektionen eingesetzt, sodass eine Hepatotoxizität, zumindest bei niedrigen Konzentrationen, eher unwahrscheinlich ist.

Neben der Leber sind einige CYP450-Isoenzyme auch im Dünndarm lokalisiert und am Metabolismus oral verabreichter Xenobiotika beteiligt, wobei die Isoenzyme CYP3A und CYP2C den Hauptanteil ausmachen (Zhang et al. 1999; Paine et al. 2006; Thelen and Dressman 2009). In unseren Untersuchungen hatte Primaquin zwar kaum einen zytotoxischen Effekt auf Enterozyten der Linie TC7, jedoch sind gastrointestinale Beschwerden, wie abdominelle Krämpfe, Übelkeit und Erbrechen häufig beschriebene Nebenwirkungen von Primaquin. Unter diesen genannten Aspekten müsste die Toxizität des Malariamedikaments für solch hohe Konzentrationen, wie sie für die antitumorale Wirkung erforderlich sind, im Rahmen von Phase-I-Studien und langsamer Dosissteigerung erfasst werden.

Neben einer möglichen Hepatotoxizität und gastrointestinalen Beschwerden müssen Patienten, die höhere Primaquinkonzentrationen einnehmen auch bezüglich einer Methämoglobinämie und hämolytischer Anämie beobachtet werden. Auf Grund eines reduzierten antioxidativen Schutzes ist Primaquin streng kontraindiziert für Patienten mit einem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Dieser genetische Defekt unterliegt einem X-chromosomal-rezessivem Erbgang, was bedeutet, dass vorwiegend Männer betroffen sind. Frauen zeigen dagegen den voll ausgeprägten Phänotyp nur, wenn die Mutation homozygot vorliegt, was sich wiederum günstig auf den möglichen Einsatz von Primaquin zur Behandlung von Brustkrebspatientinnen auswirken würde.

Alternativ zur Einnahme höherer Konzentrationen für die Krebstherapie, wäre auch die Kombination von Primaquin mit Substanzen denkbar, die den Wirkmechanismus des Malariamedikaments verstärken. In dieser Arbeit haben wir die pro-oxidative Eigenschaft von Primaquin mit einem Inhibitor des Antioxidanzsystems kombiniert. Das Antirheumatikum

Auranofin, als Inhibitor der Thioredoxin-Reduktase, wies sowohl im MTT-Zellvitalitätstest, als auch an dreidimensionalen Tumorsphäroiden einen additiven Effekt in Kombination mit Primaquin auf, wodurch sich die Primaquinkonzentration bei einer Inkubationszeit von 48 h auf 10  $\mu$ M reduzieren ließ.

#### 4.5 Ausblick

Brustkrebs ist die häufigste weibliche Krebserkrankung und die weltweit häufigste krebssbedingte Todesursache der Frau. Während die Inzidenzraten in industrialisierten Ländern wie Westeuropa und den USA am höchsten sind und weiter steigen, hat die Mortalität dort, dank fortschrittlicher Therapien und Mammographiescreening, eine stabile Phase erreicht und ist teilweise sogar rückläufig (Torre et al. 2015). In tropischen Regionen wie Afrika, Südostasien und Südamerika, in denen die Malaria endemisch ist, tritt die Erkrankung zwar seltener auf (Torre et al. 2015), allerdings ist die brustkrebsbedingte Mortalität in Entwicklungsländern, auf Grund einer meist späten Diagnosestellung in fortgeschrittenen Krankheitsstadien und fehlendem Zugriff auf entsprechende Therapien, vergleichsweise hoch (Igene 2008; Parkin et al. 2008). Zudem wird eine steigende Inzidenz an brustkrebserkrankten Frauen in Afrika, Asien und Südamerika beobachtet (Torre et al. 2015), teils durch Adaptation eines westlichen Lebensstils und veränderten Reproduktionsmusters mit abnehmender Geburtenrate, erhöhtem Alter bei der ersten Schwangerschaft und verkürzter Stillzeit (Parkin et al. 2008).

Angesichts der steigenden Inzidenzraten und den fehlenden finanziellen Ressourcen in der Gesundheitsversorgung, könnte Primaquin als vielseitig einsetzbare Substanz gegen Malaria, *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie, einer opportunistischen und häufig tödlich verlaufenden Infektion bei HIV- Infizierten, und als möglicher Kandidat für die Krebstherapie speziell in diesen Ländern von großer Bedeutung sein. Die gute Verträglichkeit und die sehr geringen Kosten sind weitere Argumente dafür, dieses Malariamedikament demnächst am Tiermodell und später im Rahmen klinischer Studien als potentiellles Medikament für die Krebstherapie zu testen. Dabei ist davon auszugehen, dass Primaquin entweder in Kombination mit einem Sensitizer, wie dem Auranofin, oder als pharmakologisch optimiertes Primaquinderivat eingesetzt wird.

Tafenoquin, ebenfalls ein 8-Aminoquinolin-Derivat, befindet sich derzeit in klinischen Phase III Studien zur Therapie und Prophylaxe von Malariainfektionen. Interessanterweise konnte auch bei Tafenoquin ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, durch Inhibition des Komplex-III der Atmungskette, in Leishmanien Promastigoten beobachtet werden, was mit der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale verbunden war (Carvalho et al. 2010). Ein wesentlicher Vorteil von Tafenoquin gegenüber seinem Vorgänger Primaquin ist seine bessere orale Bioverfügbarkeit und längere Halbwertszeit von 14 Tagen im Gegensatz



#### -Diskussion-

zu 4-9 Stunden bei Primaquin (Li et al. 2014). Der scheinbar ähnliche Wirkmechanismus und die verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften machen auch Tafenoquin zu einer interessanten Substanz, deren Untersuchung auf eine mögliche antitumorale Wirkung in weiteren Studien sicher lohnenswert ist.

## 5 Zusammenfassung

Angesichts der statistischen Zahlen mit Brustkrebs als führende weibliche Krebserkrankung und dem Fehlen spezifischer Therapiemöglichkeiten, besonders für triple negative Formen, ist die Suche nach neuen molekularen Zielstrukturen im Sinne einer „targeted therapy“ ein anhaltend wichtiges Gebiet in der Forschung. Immer häufiger werden dabei bereits auf dem Markt vorhandene und auf ihre Sicherheit im Menschen erprobte Medikamente auf einen möglichen antitumoralen Effekt untersucht, die sogenannte Medikamentenrepositionierung. Auch für einige Malariamedikamente konnte bereits ein antitumoraler Wirkmechanismus nachgewiesen werden, der häufig eng mit der antiinfektiven Wirkung des Medikaments assoziiert ist. Zum Beispiel zerstört Artemisin sowohl Plasmodien als auch Tumorzellen durch die Spaltung seiner endogenen Peroxidbrücke mit folgender Bildung von Superoxidradikalen und oxidativem Stress. Das 4-Aminoquinolin Chloroquin reichert sich dagegen auf Grund seiner basischen Eigenschaften im sauren Milieu der parasitären Fressvakuolen innerhalb der Erythrozyten, sowie den Lysosomen an und hemmt dort den parasitären Hämoglobinabbau, sowie den Prozess der Autophagie in Tumorzellen. Während der molekulare Wirkmechanismus von Artemisin und Chloroquin auf Tumorzellen bereits gut verstanden ist, jedoch in einigen Fällen auch mit starken Nebenwirkungen einhergehen kann, ist die antitumorale Wirkung des 8-Aminoquinolins Primaquin weitestgehend unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Primaquin im Vergleich mit Chloroquin langfristig einen stärkeren antitumoralen Effekt auf maligne epitheliale Brustkrebszellen (MCF-7, MDA-MB-231, T47-D) besitzt, jedoch nicht auf benigne Mammaepithelzellen (MCF10A) und nicht maligne Enterozyten (TC7).

Trotz des gemeinsamen Quinolingerüsts basierte der Primaquin induzierte Zelltod weder auf einer Inhibition von Autophagie, wie bei Chloroquin, noch auf einer Inhibition des molekularen Chaperons HSP90 und des HER-2-Signalwegs. Stattdessen kam es nach einer Inkubationszeit von 48 h zu einem starken Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in MCF-7-Zellen, welches der Permeabilitätszunahme und Färbung mit Trypanblau vorausging.

Primaquin kann bei Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel durch Induktion von oxidativem Stress akute hämolytische Anämien auslösen. Als Ursache dieser bekannten und dosislimitierenden Nebenwirkung wurden bereits reaktive Metabolite beschrieben, die im Rahmen des Phase-I-Metabolismus über Enzyme des Cytochrom P450-Systems gebildet werden und auf Grund ihrer Fähigkeit zu Redox-Redaktionen reaktive Sauerstoffspezies generieren. Obwohl der Großteil dieser Phase-I-Enzyme in der Leber lokalisiert ist, konnten wir sowohl fluoreszenzmikroskopisch, als auch durchflusszytometrisch

eine zeitabhängige Bildung von Superoxidradikalen in Primaquin behandelten MCF-7-Brustkrebszellen nachweisen.

Mit Hilfe der qualitativen PCR wurde das Expressionsmuster verschiedener Isoenzyme der CYP450- Familie in diversen Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231, T47-D) und vergleichend in transformierten Leberzellen (HepG2), sowie Enterozyten (TC7) untersucht. Mit Ausnahme der Zelllinie MDA-MB-231, wiesen alle untersuchten Mammakarzinomzelllinien eine hohe Expression unterschiedlicher CYP450-Isoenzyme auf, die sich durch eine Inkubation mit Primaquin zusätzlich verstärken bzw. sogar induzieren lies. Auch literarische Hinweise bestätigen eine starke und höhere Expression von CYP450-Enzymen in Mammakarzinomen verglichen mit dem nicht malignen Brustgewebe. Dieses Verteilungsmuster und die CYP450-abhängige Aktivierung von Primaquin zu seinen eigentlich toxischen Metaboliten, könnte somit eine Möglichkeit zur selektiven Aktivierung des Malariamedikaments in Brustkrebszellen darstellen.

Der Primaquin induzierte Zelltod in Brustkrebszellen durch oxidativen Stress ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit und stellt einen von mehreren möglichen Mechanismen dar, die der antitumoralen Wirkung zu Grunde liegen. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu Chloroquin, beruht der antitumorale Effekt von Primaquin nicht auf einer Inhibition von Autophagie, sondern ähnelt durch die Bildung von Superoxidradikalen eher dem Wirkmechanismus vom ansonsten strukturell unterschiedlichen Artemisinin.

Die relativ gute Verträglichkeit und sehr geringen Kosten machen Primaquin insbesondere für Entwicklungsländer, wie den tropischen Regionen Afrikas, Asiens und Südamerika, in denen die Malaria endemisch ist, zu einem besonders interessanten Kandidaten, der vielfältig einsetzbar als Malariamedikament, zur Therapie der Pneumocystis jirovecii Pneumonie, eine häufige opportunistische Infektion HIV-Infizierter, auch ein mögliches Medikament für die Krebstherapie darstellt. Zur Beurteilung der Verträglichkeit bei Einnahme höherer Primaquinkonzentrationen, wie sie zur Erzielung einer antitumoralen Wirkung notwendig sind, stellt eine vorsichtige Dosisescalation zunächst am Tiermodel und später im Rahmen klinischer Studien einen wichtigen weiterführenden Schritt in der Forschung dar.

Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die pro-oxidativen Eigenschaften von Primaquin durch Kombination mit dem Antirheumatikum Auranofin, als Inhibitor des antioxidativen Systems, verstärkt werden können und dadurch entweder eine Dosisreduktion oder eine verkürzte Expositionsdauer von Primaquin als potentiell Krebsmedikament möglich ist.

Auch für das Malariamedikament Tafenoquin, ebenfalls ein 8-Aminoquinolin, wurde ein ähnlicher Wirkmechanismus mit Bildung reaktiver Sauerstoffradikale beobachtet. Auf Grund seiner gegenüber dem Primaquin verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften, ist eine

-Zusammenfassung -

Untersuchung von Tafenoquin auf eine mögliche antitumorale Wirkung in weiteren Experimenten mit Sicherheit lohnenswert.

## Literaturverzeichnis

- Al-Sha'er MA, Taha MO (2010) Elaborate ligand-based modeling reveals new nanomolar heat shock protein 90 $\alpha$  inhibitors. *J Chem Inf Model* 50(9):1706–1723
- Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Pelkonen O, Raunio H (1997) Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(3):242–249
- Arnedos M, Bihan C, Delalogue S, Andre F (2012) Triple-negative breast cancer: are we making headway at least? *Ther Adv Med Oncol* 4(4):195–210
- Asawamahesakda W, Ittarat I, Pu YM, Ziffer H, Meshnick SR (1994) Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 38(8):1854–1858
- Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3(8):673–683
- Augustijns P, Geusens P, Verbeke N (1992) Chloroquine levels in blood during chronic treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol* 42(4):429–433
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397(2):342–344
- Bagatell R, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Pulcini EJ, Akinaga S, Benjamin IJ, Whitesell L (2000) Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin Cancer Res* 6(8):3312–3318
- Bagatell R, Whitesell L (2004) Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Mol Cancer Ther* 3(8):1021–1030
- Baird JK (2005) Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med* 352(15):1565–1577
- Baird JK, Hoffman SL (2004) Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis* 39(9):1336–1345
- Banno K, Iida M, Yanokura M, Irie H, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D (2015) Drug repositioning for gynecologic tumors: a new therapeutic strategy for cancer. *ScientificWorldJournal* 2015:341362
- Barrott JJ, Haystead T (2013) Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J* 280(6):1381–1396
- Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Etten R, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirrò E, Vigneri P, Nicotera P, Dyer MJ, Holyoake T, Salomoni P, Calabretta B (2009) Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 119(5):1109–1123
- Berdelle N, Nikolova T, Quiros S, Efferth T, Kaina B (2011) Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther* 10(12):2224–2233
-

- Berger TG, Dieckmann D, Efferth T, Schultz ES, Funk JO, Baur A, Schuler G (2005) Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma--first experiences. *Oncol Rep* 14(6):1599–1603
- Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 124(1):128–145
- Betteridge DJ (2000) What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2 Suppl 1):3–8
- Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 66(1):3–14
- Blagosklonny MV (2000) Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14(8):1502–1508
- Bolchoz L, Morrow JD, Jollow DJ, McMillan DC (2002) Primaquine-induced hemolytic anemia: effect of 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline on rat erythrocyte sulfhydryl status, membrane lipids, cytoskeletal proteins, and morphology. *J Pharmacol Exp Ther* 303(1):141–148
- Bolchoz LJ, Budinsky RA, McMillan DC, Jollow DJ (2001) Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J Pharmacol Exp Ther* 297(2):509–515
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92(16):7162–7166
- Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5(1):21–26
- Bowman ZS, Jollow DJ, McMillan DC (2005a) Primaquine-induced hemolytic anemia: role of splenic macrophages in the fate of 5-hydroxyprimaquine-treated rat erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 315(3):980–986
- Bowman ZS, Morrow JD, Jollow DJ, McMillan DC (2005b) Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther* 314(2):838–845
- Bowman ZS, Oatis JE, Whelan JL, Jollow DJ, McMillan DC (2004) Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther* 309(1):79–85
- Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Ginkelmaiers A, Friese K, Lenhard M, Burges A (2009) Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis. *Cancer Biol Ther* 8(3):226–232
- Brüning A, Friese K, Burges A, Mylonas I (2010) Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 12(4):R45
- Brüning A, Kast RE (2014) Oxidizing to death: disulfiram for cancer cell killing. *Cell Cycle* 13(10):1513–1514
- Cabello CM, Lamore SD, Bair WB, Qiao S, Azimian S, Lesson JL, Wondrak GT (2012) The redox antimalarial dihydroartemisinin targets human metastatic melanoma cells but not primary melanocytes with induction of NOXA-dependent apoptosis. *Invest New Drugs* 30(4):1289–1301

- Carr A, Frei B (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13(9):1007–1024
- Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, Gamarro F (2010) Tafenoquine, an antiparasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12):5344–5351
- Chen H, Sun B, Pan S, Li J, Xue D, Meng Q, Jiang H (2009) Study on anticancer effect of dihydroartemisinin on pancreatic cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 47(13):1002–1005
- Chen H, Zhou H, Wu G, Lou X (2004) Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/flk-1. *Pharmacology* 71(1):1–9
- Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB (2012) Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol* 30(7):671–678
- Chow WA, Jiang C, Guan M (2009) Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? *Lancet Oncol* 10(1):61–71. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70334-6
- CONAN NJ (1948) The treatment of amebic hepatitis with chloroquine. *Bull N Y Acad Med* 24(8):545
- Constantino L, Paixão P, Moreira R, Portela MJ, Do Rosario VE, Iley J (1999) Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. *Exp Toxicol Pathol* 51(4-5):299–303
- Dade J, Provot O, Moskowitz H, Mayrargue J, Prina E (2001) Synthesis of 2-substituted trifluoromethylquinolines for the evaluation of leishmanicidal activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49(4):480–483
- Dagli H (2007) Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. *J Membr Biol* 218(1-3):79–91
- Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262(20):9895–9901
- Decoursey TE, Ligeti E (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2173–2193
- Dell'Eva R, Pfeffer U, Vené R, Anfosso L, Forlani A, Albini A, Efferth T (2004) Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate. *Biochem Pharmacol* 68(12):2359–2366
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105(6):2253–2277
- Dhingra V, Rao KV, Narasu ML (1999) Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci* 66(4):279–300
- Ding Y, Nguyen TA (2013) PQ1, a quinoline derivative, induces apoptosis in T47D breast cancer cells through activation of caspase-8 and caspase-9. *Apoptosis* 18(9):1071–1082

- Edwards G, McGrath CS, Ward SA, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, Davis TM, White NJ (1993) Interactions among primaquine, malaria infection and other antimalarials in Thai subjects. *Br J Clin Pharmacol* 35(2):193–198
- Efferth T (2005) Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist Updat* 8(1-2):85–97
- Efferth T (2006) *Molekulare und zelluläre Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen der Arzneimittelwirkung*, 1. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
- Efferth T (2007) Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside. *Planta Med* 73(4):299–309
- Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, Häfer R, Stamminger T, Oesch F, Kaina B, Marschall M (2004a) Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med* 37(7):998–1009
- Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR (2001) The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol* 18(4):767–773
- Efferth T, Ramirez T, Gebhart E, Halatsch M-E (2004b) Combination treatment of glioblastoma multiforme cell lines with the anti-malarial artesunate and the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor OSI-774. *Biochem Pharmacol* 67(9):1689–1700
- Efferth T, Rücker G, Falkenberg M, Manns D, Olbrich A, Fabry U, Osieka R (1996) Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. *Arzneimittelforschung* 46(2):196–200
- Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, Rauch P, Weber HO, Hengstler JG, Halatsch M-E, Volm M, Tew KD, Ross DD, Funk JO (2003) Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol Pharmacol* 64(2):382–394
- Egger ME, Huang JS, Yin W, McMasters KM, McNally LR (2013) Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma. *J Surg Res* 184(1):274–281
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495–516
- El-Rayes BF, Ali S, Heilbrun LK, Lababidi S, Bouwman D, Visscher D, Philip PA (2003) Cytochrome p450 and glutathione transferase expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 9(5):1705–1709
- Enmon R, Yang W-H, Ballangrud AM, Solit DB, Heller G, Rosen N, Scher HI, Sgouros G (2003) Combination treatment with 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin and acute irradiation produces supra-additive growth suppression in human prostate carcinoma spheroids. *Cancer Res* 63(23):8393–8399
- Ethell DW, Buhler LA (2003) Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol* 23(6):439–446
- Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J (2006) Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14(9):3218–3222



- Fernandes I, Vale N, Freitas V de, Moreira R, Mateus N, Gomes P (2009) Anti-tumoral activity of imidazoquinones, a new class of antimalarials derived from primaquine. *Bioorg Med Chem Lett* 19(24):6914–6917
- Fletcher KA, Barton PF, Kelly JA (1988) Studies on the mechanisms of oxidation in the erythrocyte by metabolites of primaquine. *Biochem Pharmacol* 37(13):2683–2690
- Foley M, Tilley L (1998) Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther* 79(1):55–87
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182(1):41–49
- Francia G, Man S, Teicher B, Grasso L, Kerbel RS (2004) Gene Expression Analysis of Tumor Spheroids Reveals a Role for Suppressed DNA Mismatch Repair in Multicellular Resistance to Alkylating Agents. *Mol Cell Biol* 24(15):6837–6849
- Frei B, Stocker R, England L, Ames BN (1990) Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264:155–163
- Fritz R, Bol J, Hebling U, Angermüller S, Völkl A, Fahimi HD, Mueller S (2007) Compartment-dependent management of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peroxisomes. *Free Radic Biol Med* 42(7):1119–1129
- Gakhar G, Hua DH, Nguyen TA (2010) Combinational treatment of gap junctional activator and tamoxifen in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 21(1):77–88
- Gakhar G, Ohira T, Shi A, Hua DH, Nguyen TA (2008) Antitumor effect of substituted quinolines in breast cancer cells. *Drug Dev Res* 69(8):526–534
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1):107–120
- Gandhi S, Fletcher GG, Eisen A, Mates M, Freedman OC, Dent SF, Trudeau ME (2015) Adjuvant chemotherapy for early female breast cancer: a systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline. *Curr Oncol* 22(Suppl 1):94
- Ganesan S, Tekwani BL, Sahu R, Tripathi LM, Walker LA (2009) Cytochrome P(450)-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(1):14–22
- Garraway LA, Jänne PA (2012) Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov* 2(3):214–226
- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221(1):3–12

- Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J (2009) Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20(8):1319–1329
- Gonzalez FJ, Gelboin HV (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 26(1-2):165–183
- Gribben JG, Ryan DP, Boyajian R, Urban RG, Hedley ML, Beach K, Nealon P, Matulonis U, Campos S, Gilligan TD, Richardson PG, Marshall B, Neuberg D, Nadler LM (2005) Unexpected association between induction of immunity to the universal tumor antigen CYP1B1 and response to next therapy. *Clin Cancer Res* 11(12):4430–4436
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C, Fass D (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 103(2):299–304
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJ (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 11(7):526–534
- Guengerich FP (1992) Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther* 54(1):17–61
- Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14(6):611–650
- Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8(1):11
- Guengerich FP, Wu Z-L, Bartleson CJ (2005) Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1):465–469
- Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Brüning T, Ko Y, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H, Fischer H-P (2006) Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 119(8):1785–1791
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344(8924):721–724
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281(1-2):9–19
- Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486(1):10–13
- Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 307(1):108–112
- Halliwell B, Gutteridge JM (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, New York
- Hamacher-Brady A, Stein HA, Turschner S, Toegel I, Mora R, Jennewein N, Efferth T, Eils R, Brady NR (2011) Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 286(8):6587–6601

- Hawkins CL, Brown BE, Davies MJ (2001) Hypochlorite- and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Arch Biochem Biophys* 395(2):137–145
- Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR (1996) 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93(18):9776–9781
- Heiniger B, Gakhar G, Prasain K, Hua DH, Nguyen TA (2010) Second-generation substituted quinolines as anticancer drugs for breast cancer. *Anticancer Res* 30(10):3927–3932
- Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ (2006) Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg* 75(3):402–415
- Hudis CA (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357(1):39–51
- Igene H (2008) Global health inequalities and breast cancer: an impending public health problem for developing countries. *Breast J* 14(5):428–434
- Iscan M, Kaauniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O, Raunio H (2001) The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 70(1):47–54
- Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R (2011) Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8(9):528–539
- Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C (2013) Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 332(2):275–285
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425(6956):407–410
- Kaminsky LS, Fasco MJ (1991) Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 21(6):407–422
- Karlenius TC, Tonissen KF (2010) Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)* 2(2):209–232
- Karow T LR (ed) (2014) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 22nd edn. Thomas Karow, Pulheim
- Kast RE, Boockvar JA, Brüning A, Cappello F, Chang W-W, Cvek B, Dou QP, Duenas-Gonzalez A, Efferth T, Focosi D, Ghaffari SH, Karpel-Massler G, Ketola K, Khoshnevisan A, Keizman D, Magné N, Marosi C, McDonald K, Muñoz M, Paranjpe A, Pourgholami MH, Sardi I, Sella A, Srivenugopal KS, Tuccori M, Wang W, Wirtz CR, Halatsch M-E (2013) A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget* 4(4):502–530
- Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1):43–50

- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8):2013–2026
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239–257
- Kim JH, Scialli AR (2011) Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 122(1):1–6
- Kim J-H, Choi A-R, Kim YK, Yoon S (2013) Co-treatment with the anti-malarial drugs mefloquine and primaquine highly sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing P-gp inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 441(3):655–660
- Kimmelman AC (2011) The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 25(19):1999–2010
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y (2013) Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 73(1):3–7
- Kivistö KT, Kroemer HK, Eichelbaum M (1995) The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* 40(6):523–530
- Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6):620–650
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619–642
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1463–1467
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1):99–163
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171(9):4672–4679
- Lai H, Sasaki T, Singh NP, Messay A (2005) Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sci* 76(11):1267–1279
- Lai H, Singh NP (1995) Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Lett* 91(1):41–46
- Lai H, Singh NP (2006) Oral artemisinin prevents and delays the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Lett* 231(1):43–48
- Leist M, Nicotera P (1997) The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236(1):1–9

- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8):1481–1486
- Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Meteleev V, Pardee AB (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268(5209):429–431
- Li Q, O'Neil M, Xie L, Caridha D, Zeng Q, Zhang J, Pybus B, Hickman M, Melendez V (2014) Assessment of the prophylactic activity and pharmacokinetic profile of oral tafenoquine compared to primaquine for inhibition of liver stage malaria infections. *Malar J* 13:141
- Li Y, Wu YL (1998) How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? *Med Trop (Mars)* 58(3 Suppl):9–12
- Li YY, Jones SJ (2012) Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Med* 4(3):27
- Liehr JG, Ricci MJ (1996) 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93(8):3294–3296
- Limón-Pacheco J, Gonshebbat ME (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 674(1-2):137–147
- Loewenstein WR, Kanno Y (1966) Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209(5029):1248–1249
- Lu J-J, Chen S-M, Zhang X-W, Ding J, Meng L-H (2011) The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Invest New Drugs* 29(6):1276–1283
- Macintosh RL, Ryan KM (2013) Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol* 23(5):344–351
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1):3–15
- Maloney A, Workman P (2002) HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther* 2(1):3–24
- Mancias JD, Kimmelman AC (2011) Targeting autophagy addiction in cancer. *Oncotarget* 2(12):1302–1306
- Marx J (2006) Autophagy: is it cancer's friend or foe? *Science* 312(5777):1160–1161
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16(10):577–586
- McFadyen MC, McLeod HL, Jackson FC, Melvin WT, Doehmer J, Murray GI (2001) Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression. *Biochem Pharmacol* 62(2):207–212
- McFadyen, Morag C E, Murray GI (2005) Cytochrome P450 1B1: a novel anticancer therapeutic target. *Future Oncol* 1(2):259–263

- Meinão IM, Sato EI, Andrade LE, Ferraz MB, Atra E (1996) Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 5(3):237–241
- Meshnick SR (2002) Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* 32(13):1655–1660
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4):728–741
- Mizushima N, Yoshimori T (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3(6):542–545
- Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler M, Moynahan ME, Sugarman S, Ma W, Patil S, Norton L, Hannah AL, Hudis C (2011) HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin Cancer Res* 17(15):5132–5139
- Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R, Ma W, Wheler J, Rosen N, Norton L, Cropp GF, Johnson RG, Hannah AL, Hudis CA (2007) Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol* 25(34):5410–5417
- Mohamed A, Krajewski K, Cakar B, Ma CX (2013) Targeted therapy for breast cancer. *Am J Pathol* 183(4):1096–1112
- Moore JC, Lai H, Li JR, Ren RL, McDougall JA, Singh NP, Chou CK (1995) Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett* 98(1):83–87
- Morrissey C, Gallis B, Solazzi JW, Kim BJ, Gulati R, Vakar-Lopez F, Goodlett DR, Vessella RL, Sasaki T (2010) Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells. *Anticancer Drugs* 21(4):423–432
- Munshi A (2009) Chloroquine in glioblastoma--new horizons for an old drug. *Cancer* 115(11):2380–2383
- Münster PN, Basso A, Solit D, Norton L, Rosen N (2001) Modulation of Hsp90 function by ansamycins sensitizes breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis in an RB- and schedule-dependent manner. See: E. A. Sausville, Combining cytotoxics and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin: sequence and tumor biology matters, *Clin. Cancer Res.*, 7: 2155-2158, 2001. *Clin Cancer Res* 7(8):2228–2236
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1–13
- Murray GI (2000) The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy. *J Pathol* 192(4):419–426
- Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD (1988) The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br J Clin Pharmacol* 25(4):465–475

- Murray GI, Patimalla S, Stewart KN, Miller ID, Heys SD (2010) Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology* 57(2):202–211
- Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57(14):3026–3031
- Nair A, Abrahamsson B, Barends DM, Groot DW, Kopp S, Polli JE, Shah VP, Dressman JB (2012) Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: primaquine phosphate. *J Pharm Sci* 101(3):936–945
- Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T (2008) Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *Int J Pharm* 354(1-2):28–33
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1):1–42
- Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31(11):1287–1312
- Omura T., Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370–2378
- O'Neill PM, Posner GH (2004) A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 47(12):2945–2964
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* 34(5):880–886
- Papaioannou M, Mylonas I, Kast RE, Brüning A (2014) Disulfiram/copper causes redox-related proteotoxicity and concomitant heat shock response in ovarian cancer cells that is augmented by auranofin-mediated thioredoxin inhibition. *Oncoscience* 1(1):21–29
- Parkin DM, Sitas F, Chirenje M, Stein L, Abratt R, Wabinga H (2008) Part I: Cancer in Indigenous Africans--burden, distribution, and trends. *Lancet Oncol* 9(7):683–692
- Perchellet (2010) Bioactivity and molecular targets of novel substituted quinolines in murine and human tumor cell lines in vitro. *Int J Oncol* 36(3)
- Percy MJ, McFerran NV, Lappin, Terry R J (2005) Disorders of oxidised haemoglobin. *Blood Rev* 19(2):61–68
- Peters W (1999) The evolution of tafenoquine--antimalarial for a new millennium? *J R Soc Med* 92(7):345–352
- Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM (2007) High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 67(7):2932–2937
- Porter JR, Fritz CC, Depew KM (2010) Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol* 14(3):412–420

- Power A, Berger AC, Ginsburg GS (2014) Genomics-enabled drug repositioning and repurposing: insights from an IOM Roundtable activity. *JAMA* 311(20):2063–2064
- Powis G, Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421–455
- Price R, van Vugt M, Nosten F, Luxemburger C, Brockman A, Phaipun L, Chongsuphajaisiddhi T, White N (1998) Artesunate versus artemether for the treatment of recrudescant multidrug-resistant falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 59(6):883–888
- Prodromou C, Pearl LH (2003) Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets* 3(5):301–323
- Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, Vuong C, Sciotti RJ, Reichard GA, Kozar MP, Walker LA, Ohrt C, Melendez V (2012) CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J* 11:259
- Rahim R, Strobl JS (2009) Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 20(8):736–745
- Rassow J (ed) (2008) *Duale Reihe Biochemie*, 2. aktualisierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Reizenstein P (1991) Iron, free radicals and cancer. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 8(4):229–233
- Riddick DS, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, Patterson AV, Stratford IJ, Morrow CS, Townsend AJ, Jounaidi Y, Chen C-S, Su T, Lu H, Schwartz PS, Waxman DJ (2005) Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 33(8):1083–1096. doi: 10.1124/dmd.105.004374
- Rieger MA, Ebner R, Bell DR, Kiessling A, Rohayem J, Schmitz M, Temme A, Rieber EP, Weigle B (2004) Identification of a novel mammary-restricted cytochrome P450, CYP4Z1, with overexpression in breast carcinoma. *Cancer Res* 64(7):2357–2364
- Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25(11):1679–1691
- Ruch RJ (1994) The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 24(3):216–231
- Sadava D, Phillips T, Lin C, Kane SE (2002) Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 179(2):151–156
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3):311–322
- Schuetz EG, Schuetz JD, Grogan WM, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Raucy J, Guzelian P, Gionela K, Watlington CO (1992) Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 294(1):206–214



- Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749–774
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65(1):5–29
- Singh N, Verma K (2002) Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated with artesunate. *Arch Oncol* 10(4):279–280
- Singh NP, Lai H (2001) Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* 70(1):49–56
- Slater AF (1993) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 57(2-3):203–235
- Solomon VR, Lee H (2009) Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 625(1-3):220–233
- Stadtman ER, Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266(4):2005–2008
- Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J (2014) Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*
- Taylor WR, White NJ (2004) Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf* 27(1):25–61
- Tekwani BL, Walker LA (2006) 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis* 19(6):623–631
- Thelen K, Dressman JB (2009) Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol* 61(5):541–558
- Toma E, Thorne A, Singer J, Raboud J, Lemieux C, Trottier S, Bergeron MG, Tsoukas C, Falutz J, Lalonde R, Gaudreau C, Therrien R (1998) Clindamycin with primaquine vs. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for mild and moderately severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a multicenter, double-blind, randomized trial (CTN 004). CTN-PCP Study Group. *Clin Infect Dis* 27(3):524–530
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(2):87–108
- Townsend KN, Hughson, Luke R K, Schlie K, Poon VI, Westerback A, Lum JJ (2012) Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity. *Immunol Rev* 249(1):176–194
- Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, Minckwitz G von, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer J-U, Costa S-D, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück H-J, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A (2013) 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013). *Breast Care (Basel)* 8(3):221–229

- Vale N, Moreira R, Gomes P (2009) Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* 44(3):937–953
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266(1-2):37–56
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin, Mark T D, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44–84
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1):1–40
- Van den Eijnde, S M, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw, C I, Vermeij-Keers C (1997) Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 4(4):311–316
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31(1):1–9
- Verma R, Bowen RL, Slater SE, Mihaimeed F, Jones JL (2012) Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. *Br Med Bull* 103(1):129–145
- Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR (2003) Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol* 24(9):512–517
- Wang Q, Wu L-m, Zhao Y, Zhang X-l, Wang N-p (2002) The anticancer effect of artesunate and its mechanism. *Yao Xue Xue Bao* 37(6):477–478
- Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U (1992) Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358(6382):169–170
- Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M (2003) New antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed Engl* 42(43):5274–5293
- Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingré TM, el-Feraly FS, Kampinga HH, Konings AW (1993) Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *J Nat Prod* 56(6):849–856
- Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28(1):32–40
- Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N (2007) Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci* 1113:202–216
- Wrighton SA, Stevens JC (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 22(1):1–21
- Xie X, White EP, Mehnert JM (2013) Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS ONE* 8(1):e55096

- Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12(9):814–822
- Yardley DA (2013) Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer* 2013:137414
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 199(3):316–331
- Zeiss CJ (2003) The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol* 40(5):481–495
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS (1999) Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27(7):804–809
- Zheng Y, Zhao Y-L, Deng X, Yang S, Mao Y, Li Z, Jiang P, Zhao X, Wei Y (2009) Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis. *Cancer Invest* 27(3):286–292
- Zhou Q, Melkounian ZK, Lucktong A, Moniwa M, Davie JR, Strobl JS (2000) Rapid induction of histone hyperacetylation and cellular differentiation in human breast tumor cell lines following degradation of histone deacetylase-1. *J Biol Chem* 275(45):35256–35263

Strukturformel Primaquin:

<http://quod.lib.umich.edu/cgi/i/image/api/image/medchem1ic/290/PRIMAQUINE>

(zuletzt abgerufen am 09.04.17 17:54)

## **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt mitarbeiten zu dürfen.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. rer. nat. Ansgar Brüning für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden, die exzellente und durchgehende Betreuung während der gesamten Laborarbeit, während der Phase des Schreibens und für die Durchsicht dieser Arbeit, die ohne sein Fachwissen und seine tatkräftige Unterstützung bei der Klärung von inhaltlichen Fragen und komplexen Zusammenhängen nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeiterinnen der Frauenklinik, Frau Petra Burger und Frau Martina Rahmeh für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der MTT- und FACS-Analysen.

Meinen Eltern möchte ich außerdem danken für ihre unerschöpfliche Unterstützung und Ermutigung während des gesamten Medizinstudiums sowie in der Phase der Promotion.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Giovanna Giampieri, erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchungen zur antitumoralen Wirkung von Malariamedikamenten auf Brustkrebszellen am Beispiel von Primaquin und Chloroquin**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, den 20.05.2017

Giovanna Giampieri

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| Name                | Giovanna Giampieri |
| Geburtsdatum        | 04.05.1990         |
| Geburtsort          | Berlin             |
| Staatsangehörigkeit | deutsch            |

### Ausbildung

|            |  |
|------------|--|
| 2000- 2009 | Jesuitengymnasium Canisius-Kolleg, Berlin Tiergarten,<br>Abschluss: allgemeines Abitur |
|------------|--|

### Hochschulausbildung

|               |  |
|---------------|--|
| 2009- 2016    | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| März 2012     | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                                    |
| April 2015    | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                                    |
| November 2016 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                                    |